



FORSCHUNGSKREIS DER
ERNÄHRUNGSINDUSTRIE E.V.

F&E

Dokumentation

AiF 18814 N

**„Klärung der Ursachen des bitter-
adstringierenden Fehlgeschmacks von
pflanzlichen Proteinisolaten und
Erarbeitung technologischer Parameter für
eine Qualitätsverbesserung“**

– Schlussbericht 2018 –

**Projekt der Industriellen
Gemeinschaftsforschung**



Forschungsstelle I:

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan WZW
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik
Lise-Meitner-Str. 34
85354 Freising

Tel.: +49 8161 71-2901

Fax: +49 8161 71-2949

E-Mail: thomas.hofmann@tum.de

Internet: www.wzw.tum.de

Projektleiter:

Prof. Dr. Thomas Hofmann
Dr. Corinna Dawid

Forschungsstelle II:

Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung (IVV)
Giggenhauser Straße 35, 85354 Freising

Tel: +49 8161 491-100

Fax: +49 8161 491-111

E-Mail: langowski@ivv.fraunhofer.de

Internet: www.ivv.fraunhofer.de

Projektleiter:

Prof. Dr. Horst-Christian Langowski
Dr. Peter Eisner

Eine Publikation dieses Berichts oder der hierin aufgeführten Daten
ist ohne Zustimmung der Projektleitung nicht gestattet.

Bewilligungszeitraum: 1.9.2015 – 30.4.2018

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde über die AIF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Datum des Berichts: 27.7.2018

1 Zusammenfassung und Ausblick

Ein besonders wichtiges Qualitätskriterium beim Verzehr von Lebensmitteln stellt neben der Farbe, dem Aroma und der Textur auch der unverwechselbare Geschmack dar. Pflanzliche Proteine, die aufgrund ihrer technofunktionellen Eigenschaften als Emulgatoren, Schaumbildner oder Wasserbinder bei der Herstellung verschiedener Lebensmittel eingesetzt werden, weisen jedoch oftmals einen langanhaltenden bitter-adstringierenden Fehlgeschmack auf. In Abhängigkeit der Lebensmittelapplikation können diese Fehlgeschmacksattribute derart in den Vordergrund treten, dass die Verwendung von pflanzlichen Proteinpräparaten in Lebensmitteln nur eingeschränkt bzw. nicht ohne maskierende Zusatzstoffe möglich ist.

Um den bitter-adstringierenden Fehlgeschmack auf molekularer Ebene zu verstehen wurden im Rahmen der bislang durchgeführten Experimente die Geschmacksprofile verschiedener handelsüblicher Erbsen- und Sojaproteinisolat von einem geschulten Sensorikpanel der Forschungsstelle 1 vergleichend zueinander sensorisch beurteilt. Dabei wiesen alle verkosteten Proteinisolat der beiden Leguminosen sowohl bittere als auch adstringierende Noten auf. Sensorische Vorexperimente zeigten zudem, dass die zwei Proteinisolat Nutralys S85F 5006541 (Erbsenproteinisolat) und Supro XT 219DIP 2013 (Sojaproteinisolat) bei pH 5,5 als geeignete Referenzen bei humansensorischen Studien herangezogen werden können. Der pH-Wert hat keinen signifikanten Einfluss auf die Geschmacksattribute bitter und adstringierend der zwei getesteten Proteinisolat.

Mit dem Ziel die Geschmacksstimuli der zwei Proteinisolat zu isolieren, identifizieren und sensorisch zu charakterisieren wurden bereits unterschiedliche Extraktionsverfahren angewendet. Zur Abtrennung der Fehlgeschmacksstoffe vom Erbsenproteinisolat erwies sich ein Gemisch aus MeOH/H₂O (1+1; v+v) als geeignet. Der unlösliche Rückstand konnte als weniger bitter eingestuft werden (3-AFC-Test und Befragung eines Konsenspanels). Der geschmacksaktive Extrakt wurde mittels MPLC-ELSD-Methoden in 13 Fraktionen aufgetrennt. Durch eine anschließende Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) konnte Fraktion 11 als geschmacksaktivste identifiziert werden. Diese wurde nachfolgend durch eine präparative HPLC-Methode weiter subfraktioniert. Diese 17 Subfraktionen wurden ebenfalls mittels GVA untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass vor allem die unpolaren Subfraktionen I-11-13, I-11-14, I-11-15, I-11-16 und I-11-17 eine hohe Bitteraktivität aufweisen. Auch konnte Subfraktion I-11-8 als bitter identifiziert werden.

Mittels UHPLC-ToF-MS-Messungen wurden in den Fraktionen I-11-13 bis I-11-15 bekannte Masse-Ladungsverhältnisse und Fragmentierungsmuster von Lipidoxidationsprodukten ausgemacht. So lieferten die Messungen Hinweise auf die Existenz von 9-HODE/13-HODE, 9-Oxooctadeca-10,12-diensäure/13-Oxooctadeca-9,11-diensäure und 9,10,13-Trihydroxyoctadec-10-ensäure in den untersuchten Subfraktionen.

Um den Fehlgeschmack genau zu lokalisieren, wurden die bittersten Subfraktionen final chromatographisch aufgetrennt und die Struktur der isolierten Verbindungen mittels massenspektrometrischer (UHPLC-ToF-MS und MS/MS) und kernspinspektroskopischer Experimente (NMR) aufgeklärt. Für Subfraktion I-11-16 und I-11-17 konnte dabei eine geeignete HPLC-Trennmethode im semipräparativen Maßstab entwickelt werden. Dabei kam spezielles C5-Säulenmaterial zum Einsatz.

Aus Subfraktion I-11-16 konnten somit Isomere von 9-HODE und 13-HODE, sowie 1-Linoleoylglycerol, Linolensäure, 2-Hydroxypalmitinsäure, 2-Hydroxyölsäure und Linolsäure identifiziert werden. In Subfraktion I-11-17 konnte mit Octacosäure-6,9,19,22-tetraen eine nicht literaturbekannte Substanz postuliert werden.

Für 2-Hydroxypalmitinsäure und 2-Hydroxyölsäure konnten humane Geschmacksschwellenwerte bestimmt werden. Dabei wurden Schwellenwerte von 0,22 mmol/l für 2-Hydroxypalmitinsäure und 0,06 mmol/l für 2-Hydroxyölsäure bestimmt.

Zusätzliche UHPLC-ToF-MS-Messungen der gewonnenen MPLC-Fractionen zeigten außerdem, dass literaturbekannte bitter schmeckende Verbindungen, wie das Soyasaponin I im Extrakt zu finden sind. Die Existenz dieser Verbindung konnte durch Vergleich der Elementarzusammensetzung, Retentionszeit und Fragmentierungsmuster des Extraktes mit einem kommerziell erwerblichen Standard verifiziert werden. Die entsprechende GVA ergab jedoch, dass der Einfluss von Soyasaponin I auf den Fehlgeschmack des Isolats als gering einzustufen ist.

Massenspektrometrische Untersuchungen des Methanol/H₂O-Extraktes aus Sojaproteinisolaten lieferten außerdem Hinweise auf die Anwesenheit von Genistin, Genistein, Daidzein und Soyasaponin I.

Die funktionelle Charakterisierung kommerziell verfügbarer Isolate aus Erbse, Soja und Raps wurde mit an Forschungsstelle 2 etablierten Standardmethoden zur Beurteilung der Löslichkeit, der Emulgierkapazität, der Partikelgrößenverteilung sowie der Zusammensetzung und der thermischen Eigenschaften mittels DSC (Differential Scanning Calorimetry) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die kommerziellen Erbsenproteinisolate über den untersuchten pH-Bereich von pH 3 bis pH 9 sehr geringe Löslichkeiten von < 20% aufwiesen. Die Sojaproteinisolate wiesen ebenfalls niedrige bis mittlere Löslichkeiten von < 20% bis etwa 50% bei pH 7 auf. Die untersuchten Rapsproteinisolate hatten hingegen sehr hohe Proteinlöslichkeiten von > 80% über den untersuchten pH-Bereich. Im Gegensatz zu den Löslichkeiten unterschieden sich die Emulgierkapazitäten der kommerziellen Isolate deutlich voneinander und es konnte kein eindeutiger Trend ermittelt werden. Die unterschiedlichen Funktionalitätsprofile sind dabei höchstwahrscheinlich auf unterschiedliche Herstellverfahren zurückzuführen.

Für die Gewinnung hochaufgereinigter Fraktionen aus Erbsen, Sojabohnen und Raps wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Verfahren hinsichtlich ihrer Eignung zur Fraktionierung und Gewinnung einzelner Proteinfractionen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die in der Literatur beschriebenen Verfahren zwar zu hochaufgereinigten Einzelproteinfractionen führen, dass aber der Proteingehalt der Fraktionen aufgrund anhaftender Nebenbestandteile wie Salze, Zucker oder sekundäre Pflanzenstoffe häufig nur bei 50 bis 80% lag, so dass die Verfahren entsprechend adaptiert werden mussten. Für die Fraktionierung von Erbsenproteinen konnte ein Verfahren bestehend aus alkalischer Proteinextraktion und anschließender säulenchromatographischer Auftrennung zur Gewinnung von einer Convicillin-/Vicillin-reichen Fraktion und einer Legumin-reichen Fraktion entwickelt werden. Ebenso konnte mit einem in der Literatur beschriebenen Verfahren (DE SOUZA FERREIRA, SILVA [1]) aus Sojabohnen eine Glycinin-reiche Fraktion mit einer Reinheit von 94% gewonnen werden. Für die Fraktionierung von Rapsproteinen in Napin und Cruciferin konnten keine Verfahren identifiziert werden, die zu einer ausreichenden Reinheit führten.

Weiterhin wurde an der Forschungsstelle 2 die Optimierung des Herstellverfahrens zur Gewinnung sensorisch verbesserter Proteine vor allem aus Erbsen untersucht. Diese Fokussierung auf einen Rohstoff wurde innerhalb des PA beschlossen, da eine Vielzahl an bitter-adstringierenden Substanzen in Erbsen identifiziert wurden, die bislang nicht in der Literatur beschrieben waren. Aus diesem Grund gestaltete sich die Optimierung als schwieriger als zunächst angenommen und es wurde sich auf Erbse als Showcase fokussiert. Für die Optimierung wurden verschiedenste Verfahren ausgewählt und deren Einfluss auf die funktionellen und, bei ausgewählten Isolaten, der sensorischen Eigenschaften untersucht. Als Einflussparameter wurden die Vorbehandlung der Erbsenmehle mittels Lösemittel oder hydrothermischer Behandlung zur Enzyminaktivierung, der Einsatz einer oder mehrerer Vorextraktionen, die Extraktionsbedingungen (pH, Temperatur, s:l) sowie die Fällungs- und Konzentrierungsbedingungen (isoelektrische Fällung; Ultrafiltration, Ultrafiltration-Diafiltration; Ultrafiltration-thermische Fällung) untersucht und deren Einfluss auf die Ausbeute, die Zusammensetzung sowie die funktionellen und thermischen Eigenschaften bestimmt. Dabei zeigte sich, dass durch Lösemittelbehandlung die Farbe der Erbsenmehle signifikant verbessert werden konnte. Die funktionellen Eigenschaften waren vergleichbar mit dem vollfetten Referenzisolat. Lediglich durch Verwendung von Ethanol als alleiniges Lösemittel oder in Lösemittelmischungen verringerte sich die Ausbeute um knapp 20%, was an dem denaturierenden Effekt des Alkohols auf Proteine liegt. Da jedoch bei den sensorischen Bewertungen durch FS 1 gezeigt werden konnte, dass die Bitterkeit der vorbehandelten Isolate im Vergleich zur vollfetten Referenz deutlich anstieg, wurden die weiteren Versuche mit vollfetttem Erbsenmehl durchgeführt. Ebenso führte eine oder mehrere Vorextraktionen zu

signifikanten Ausbeuteverringernungen, weswegen diese Ansätze auch nicht weiterverfolgt wurden. Anschließend wurde der Einfluss von Extraktionsbedingungen (pH-Wert, s:l, Temperatur) sowie der Isolierungsbedingungen (isoelektrische Fällung (pH, Temperatur), Ultrafiltration (pH, Temperatur), Ultrafiltration/Diafiltration und Ultrafiltration/thermische Fällung) variiert. Dabei zeigte sich, dass insbesondere der Extraktions-pH-Wert und der Fällungs-pH-Wert die Ausbeute und die funktionellen Eigenschaften deutlich beeinflussten. Bei der Ultrafiltration wurden geringere Proteinlöslichkeiten als bei der isoelektrischen Fällung erzielt. Durch thermische Fällung wurden die Erbsenproteine weitestgehend denaturiert und die Löslichkeit nahm auf etwa 16% ab. Zusammenfassend zeigte sich, dass eine Extraktion der Erbsenproteine zwischen pH 7,5 und 8,5 bei 20 °C und einem Feststoff:Flüssigkeitsverhältnis von 1:8 bis 1:10 sowie eine isoelektrische Fällung die höchsten Ausbeuten und die besten Funktionalitäten lieferte. Bei diesen Bedingungen wurden ebenfalls Proteinisolate mit verringerter Bitterkeit und Adstringenz gewonnen. Weiterhin wurde der Einfluss einer hydrothermischen Vorbehandlung des Erbsenmehls untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Ausbeute durch die thermische Behandlung reduziert wurde. In den technischen Maßstab wurden die 2 vielversprechendsten Verfahren übertragen. So konnten bei beiden Verfahren mind. 10 kg Erbsenproteinisolat gewonnen werden. Diese Erbsenproteinisolate wurden analysiert und für Applikationsversuche verwendet.

Das Forschungsziel des mehrstufigen Projekts wurde demnach in vollem Umfang erreicht.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung und Ausblick	II
	Inhaltsverzeichnis	VI
2	Ausgangssituation	1
3	Forschungsfragen	2
	Forschungsstelle 1	3
4	Erbsenproteinisolate (<i>Pisum sativum</i> L.) - Ergebnisse und Diskussion	3
4.1	Geschmacksprofilanalyse eines Referenzerbsenproteinisolats	3
4.2	Einfluss des pH-Werts auf das Geschmacksprofil von Erbsenproteinisolaten	4
4.3	Geschmacksprofilanalysen handelsüblicher Erbsenproteinisolate	5
4.4	Aktivitätsorientierte Fraktionierung und Identifizierungsexperimente	6
4.4.1	Sequentielle Lösungsmittelextraktion	7
4.4.2	Sensorische Beurteilung des unlöslichen Rückstands	9
4.4.2.1	3-AFC-Test	9
4.4.2.2	Konsenspanel	9
4.4.3	Sensorische Beurteilung der Extrakte I bis V	9
4.4.4	MPLC-ELSD/Geschmacksverdünnungsanalyse des Extraktes I	10
4.4.5	Präparative HPLC-ELSD/Geschmacksverdünnungsanalyse von Fraktion I-11	12
4.4.6	Isolierung und Strukturaufklärung der geschmacksaktiven Substanzen aus Subfraktion I-11-16	13
4.4.6.1	I-11-16-1 – Isomere von 9-HODE und 13-HODE	14
4.4.6.2	I-11-16-2 – 1-Linoleoylglycerol	20
4.4.6.3	I-11-16-3 – Linolensäure	20
4.4.6.4	I-11-16-4 – 2-Hydroxypalmitinsäure	21
4.4.6.5	I-11-16-5 – 2-Hydroxyölsäure	23
4.4.6.6	I-11-16-6 – Linolsäure	25
4.4.7	Isolierung und Strukturaufklärung der geschmacksaktiven Substanzen aus Subfraktion I-11-17	25
4.4.7.1	I-11-17-1 – Octacosä-6,9,19,22-tetraen	26
4.5	Humane Geschmacksschwellenwerte der identifizierten Verbindungen	28
4.6	Spektroskopische Daten	30
4.6.1	I-11-16-1 – Isomere von 9-HODE und 13-HODE	30
4.6.2	I-11-16-2 – 1-Linoleoylglycerol	32
4.6.3	I-11-16-3 – Linolensäure	32
4.6.4	I-11-16-4 – 2-Hydroxypalmitinsäure	33
4.6.5	I-11-16-5 – 2-Hydroxyölsäure	33
4.6.6	I-11-16-6 – Linolsäure	34
4.6.7	I-11-17-1 – Octacosä-6,9,19,22-tetraen	34
4.7	Screening auf literaturbekannte Fehlgeschmacksstoffe in Erbsenproteinisolaten und deren Beitrag zum Fehlgeschmack	35

4.7.1	Soyasaponin I in Erbsenproteinisolaten	35
4.7.2	Lipidoxidationsprodukte in Erbsenproteinisolaten	38
5	Sojaproteinisolat (<i>Glycine max</i> L. MERR.) – Ergebnisse und Diskussion	43
5.1	Geschmacksprofilanalyse eines Referenzsojaproteinisolats.....	43
5.2	Einfluss des pH-Werts auf das Geschmacksprofil von Sojaproteinisolaten	44
5.3	Geschmacksprofilanalysen handelsüblicher Sojaproteinisolat.....	45
5.4	Aktivitätsorientierte Fraktionierung und Identifizierungsexperimente	46
5.4.1	Sequentielle Lösungsmittelextraktion	46
5.5	Identifizierung literaturbekannter Fehlgeschmacksstoffe in Sojaproteinisolaten und deren Beitrag zum Fehlgeschmack.....	48
5.5.1	Soyasaponin I und Flavonoide in Sojaproteinisolaten.....	48
6	Experimenteller Teil	52
6.1	Verwendete Materialien	52
6.1.1	Probenmaterial.....	52
6.1.2	Chemikalien	53
6.1.3	Verbrauchsmaterialien	53
6.2	Sensorische Methoden	54
6.2.1	Sensorikpanel	54
6.2.2	Geschmacksprofilanalyse eines Referenzproduktes.....	55
6.2.3	Vergleichende Geschmacksprofilanalyse.....	55
6.2.3.1	Einfluss des pH-Werts auf das Geschmacksprofil pflanzlicher Proteinisolate	55
6.2.3.2	Geschmacksprofile handelsüblicher Proteinisolate.....	56
6.2.3.3	Geschmacksprofile von Extrakten.....	56
6.2.4	Untersuchung des unlöslichen Extraktionsrückstandes auf Fehlgeschmack.....	56
6.2.4.1	3-AFC-Test	56
6.2.4.2	Konsenspanel.....	57
6.2.5	Geschmacksverdünnungsanalyse.....	57
6.2.6	Schwellenwertsbestimmung	58
6.3	Sequentielle Lösungsmittelextraktion und anschließende Aufarbeitung pflanzlicher Proteinisolate.....	59
6.3.1	Sequentielle Lösungsmittelextraktion	59
6.4	Chromatographische Aufarbeitung	60
6.4.1	MPLC-ELSD	60
6.4.1.1	Extraktaufarbeitung	60
6.4.1.2	Messparameter.....	60
6.4.2	Präparative HPLC-ELSD	61
6.4.2.1	Probenaufarbeitung	61
6.4.2.2	Messparameter.....	62
6.4.3	Semipräparative HPLC-ELSD/UV	62
6.4.3.1	Probenaufarbeitung	63
6.4.3.2	Messparameter.....	63

6.5	Massenspektrometrische Methoden	64
6.5.1	UHPLC-ToF-MS	64
6.5.1.1	Probenaufarbeitung	64
6.5.1.2	Messparameter	64
6.5.2	MS/MS-Direktinjektion.....	65
6.5.2.1	Probenaufarbeitung	65
6.5.2.2	Messparameter	66
6.5.3	GC-MS silylierter Hydroxyfettsäuren.....	66
6.5.3.1	Silylierung von Hydroxyfettsäuren	66
6.5.3.2	Messparameter	67
6.6	Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	67
6.6.1	¹ H-NMR	68
6.6.2	¹³ C-NMR.....	68
6.6.3	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT)	68
6.6.4	Homonukleare ¹ H, ¹ H-Verschiebungskorrelation (COSY)	69
6.6.5	Heteronukleare ¹ H, ¹³ C-Verschiebungskorrelation (HSQC).....	69
6.6.6	Heteronukleare ¹ H, ¹³ C- <i>Long-Range</i> -Verschiebungskorrelation (HMBC)	69
6.6.7	Heteronukleare ¹ H, ¹³ C- <i>Two-Bond</i> -Verschiebungskorrelation (H2BC).....	69
	Forschungsstelle 2.....	70
7	Funktionelle Charakterisierung kommerziell verfügbarer Isolate (AP 1b)	70
	Denaturierungsverhalten der Proteinisolate	74
8	Gewinnung von Reinfractionen (AP 2)	75
8.1	Fraktionierung von Erbsenproteinen	75
8.1.1	Fraktionierungsverfahren nach Klassen [6]	75
8.1.2	Alternatives Extraktionsverfahren	76
8.1.3	Gewinnung der Albuminfraktion aus Erbsen.....	77
8.1.4	Fraktionierung von Erbsenproteinen mittels Säulenchromatographie	78
8.2	Fraktionierung von Sojaproteinen	80
8.3	Fraktionierung von Rapsproteinen	83
8.3.1	Gewinnung Cruziferin- und Napin-angereicherter Fraktionen mittels IVV-Verfahren.....	83
8.3.2	Abreicherung von Napin aus der Cruciferin-angereicherten Fraktion.....	84
8.3.3	Aufreinigung des Cruciferins mittels säulenchromatographischer Verfahren.....	84
8.3.4	Abreicherung von sekundären Pflanzenstoffen durch Adsorption.....	85
8.3.5	Aufreinigung der Napin-angereicherten Fraktion über DEAE-Sepharose	86
8.3.6	Extraktionsverfahren nach Bérot, Compoin [10]	86
9	Optimierung von Verfahren zur Gewinnung sensorisch optimierter Proteinisolate am Beispiel Erbse (AP 6)	89
9.1	Einfluss der Vorbehandlung mit Lösemitteln.....	89
9.2	Einfluss von Vorextraktionen.....	94
9.3	Einfluss der Extraktionsbedingungen.....	95

9.4	Einfluss der Isolierungsbedingungen	97
9.5	Einfluss der hydrothermischen Vorbehandlung des Erbsenmehls	99
10	Scale-up in den Technikumsmaßstab (AP 7)	100
11	Applikationsstudien (AP 8).....	101
12	Material und Methoden	102
12.1	Bestimmung der Zusammensetzung der Isolate	102
12.2	Bestimmung der Produktfarbe	102
12.3	Bestimmung der Partikelgrößenverteilung kommerzieller Isolate	103
12.4	Fraktionierung von Erbsenproteinen.....	103
12.4.1	Extraktion und Abtrennung der Erbsenglobuline nach dem Verfahren von Klassen [6]	104
12.4.2	Vereinfachtes Extraktionsverfahren.....	104
12.4.3	Fraktionierte Fällung von Legumin und Vicillin	105
12.4.4	Gewinnung von Erbsenalbuminen.....	105
12.5	Fraktionierung von Rapsproteinen.....	105
12.5.1	Gewinnung Cruziferin- und Napin-angereicherter Fraktionen mittels IVV-Verfahren	106
	Gewinnung Napin-angereicherte Fraktion	106
12.5.2	Extraktionsverfahren nach Bérot, Compoint [10].....	109
12.6	Aufreinigung der Proteinfractionen aus Erbse, Soja und Raps	110
12.6.1	Untersuchung der säulenchromatographischen Aufreinigung von Erbsenproteinfractionen	110
12.6.2	Säulenchromatographische Aufreinigung von Raps-Cruciferin mittels Sephacryl 200 HR	110
12.6.3	Adsorption von Polyphenolen aus der Napin-angereicherten Fraktion	110
12.6.4	Aufreinigung der Napin-angereicherten Fraktion aus Raps mittels DEAE-Sepharose ..	111
12.7	Fraktionierung von Sojaproteinen.....	111
12.8	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	112
12.9	Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften	113
12.9.1	Bestimmung der Emulgierkapazität.....	113
12.9.2	Bestimmung der Proteinlöslichkeit.....	113
12.9.3	Bestimmung des Wasserbindevermögens	114
12.9.4	Bestimmung des Ölbindevermögens.....	114
12.10	Charakterisierung der Thermostabilität der Proteinisolate	115
12.11	Vorbehandlung der Erbsenmehle mit Lösemitteln.....	115
12.11.1	Lösemittlextraktion	115
12.11.2	Behandlung mit überkritischem CO ₂	115
12.12	Durchführung der Proteinextraktionen und Fällung	116
12.13	Fraktionierung der Sojaproteine in Reinfractionen	119
12.13.1	Verfahren nach Aoki et al. (1980)	119
12.13.2	Verfahren nach De Souza Ferreira et al. (2010)	119

13	Literaturverzeichnis	121
14	Dokumentation	124
14.1	Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den Zielsetzungen des Antrages	124
14.2	Angaben zum zahlenmäßigen Nachweis	130
14.3	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	130
14.4	Plan zum Ergebnistransfer	131
14.5	Bisherige Veröffentlichungen	134
14.6	Einschätzung zur Realisierbarkeit des geplanten und durchgeführten Transferkonzepts	134
14.7	Voraussichtliche Nutzung der Forschungsergebnisse	135
14.8	Angaben über gewerbliche Schutzrechte	135
14.9	Möglicher Beitrag zur Steigerung der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit der kmU ..	135
14.10	Aussagen zur voraussichtlichen industriellen Umsetzbarkeit der F&E-Ergebnisse nach Projektende	136
14.11	Förderhinweis	136
Anhänge	137
A.1	Ausbeute der sequentiellen Lösungsmittelextraktion	137
A.2	Ausbeute der MPLC-Fraktionierung	137

2 Ausgangssituation

Weltweit werden Proteinisolate aufgrund ihrer technofunktionellen Eigenschaften als Emulgatoren, Schaumbildner oder Wasserbinder bei der Herstellung verschiedener Lebensmittel wie z.B. Backwaren, Suppen, Soßen, Aufstrichen und Wurstwaren eingesetzt. Dabei finden heute insbesondere tierische Proteine wie Casein/Caseinate, Molkenproteine und Eipulver breite Anwendung, obwohl pflanzliche Proteine eine nachhaltigere Rohstoffquelle darstellen und zudem wirtschaftlich attraktiver sind. So ist allein der für die Erzeugung pflanzlicher Proteine notwendige Flächenbedarf um ca. 80% geringer als der für die Produktion tierischen Eiweißes (FAO, 2006).

Allgemein ist, im Vergleich zu tierischen Proteinen, der Einsatz von pflanzlichen Proteinkonzentraten und -isolaten aufgrund deren unerwünschten organoleptischen Eigenschaften jedoch noch unterentwickelt (Sengbusch, 1934). Pflanzliche Proteine weisen oftmals einen langanhaltenden bitter-adstringierenden Fehlgeschmack auf (Rackis., 1979; Price et al., 1985; Heng, 2005; Heng et al., 2006, und Nazareth, 2009). In Abhängigkeit der Lebensmittelapplikation können diese Fehlgeschmacksattribute derart in den Vordergrund treten, dass die Verwendung von pflanzlichen Proteinpräparaten in Lebensmitteln nur eingeschränkt bzw. nicht ohne maskierende Zusatzstoffe möglich ist. Deren Herkunft ist jedoch bis dato weitestgehend von ungeklärter Ursache.

Seit langem ist bekannt, dass bei der Isolierung von Proteinfractionen aus pflanzlichen Quellen sensorisch aktive sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe mitextrahiert werden und bei der anschließenden Proteinpräzipitation zum Teil in der Proteinfraction verbleiben. Obwohl in der Literatur verschiedenste Naturstoffklassen wie z.B. Alkaloide, Saponine, Glucosinolate, Fettsäureabbauprodukte und Polyphenole als mögliche Fehlgeschmackskomponenten diskutiert wurden (Sessa et al., 1974; Rackis et al., 1979; Price et al., 1985; Naczki et al., 1998 und Aldin et al., 2006), existieren bis heute keine systematischen Studien zur zweifelsfreien Identifizierung der für den Fehlgeschmack von Pflanzenproteinen ursächlich verantwortlichen bitter-adstringierenden Nebenbestandteilen. Weiterhin ist völlig unklar, welcher Anteil der bitter-adstringierenden Fehlgeschmacksnote auch auf den intrinsischen Eigengeschmack der Proteinmoleküle selbst zurückzuführen ist. Der Fehlgeschmack muss soweit wie möglich minimiert werden, um eines der Haupthindernisse für den zurückhaltenden Konsum von Pflanzenprotein-angereicherten Lebensmitteln zu überwinden und einen breiteren Einsatz dieser Produkte zu erreichen. Eine kenntnisgetriebene Prozessoptimierung zur Gewinnung ernährungsphysiologisch und technofunktionell hochwertiger sowie sensorisch neutraler pflanzlicher Proteinkonzentrate und -isolate setzt jedoch neue Kenntnisse zur chemischen Struktur, sensorischen Wirksamkeit und zu den Gehalten der für den Fehlgeschmack verantwortlichen Schlüsselgeschmacksstoffe voraus.

3 Forschungsfragen

Gemäß der unter 2 dargelegten Ausgangslage ergeben sich für das Forschungsprojekt folgende Fragestellungen:

- Welche nicht-proteinogenen Nebenbestandteile tragen maßgeblich zum langanhaltend bitter-adstringierenden Fehlgeschmack von pflanzlichen Protein-Produkten (Konzentraten bzw. Isolaten) bei?
- Wie hängen die Konzentration und der Geschmacksbeitrag dieser Nebenbestandteile von der Pflanzenart und den Anbaujahren ab?
- Welche intrinsische Geschmacksaktivität besitzen hochaufgereinigte, pflanzliche Protein-Fractionen nach quantitativer Abtrennung aller nicht-proteinogenen Nebenbestandteile?
- Durch welche gezielten, technologischen Maßnahmen lässt sich das Auftreten des bitter-adstringierenden Fehlgeschmacks bei der Gewinnung von pflanzlichen Proteinpräparaten minimieren?
- Wo liegen die Wirkkonzentrationsschwellenwerte dieser Verbindungen in Lebensmittelapplikationen für das Auftreten des Fehlgeschmacks bzw. für die Beeinflussung der Technofunktionalität der Proteine?

Forschungsstelle 1

4 Erbsenproteinisolate (*Pisum sativum* L.) - Ergebnisse und Diskussion

Erbsenproteinisolate weisen einen bitter-adstringierenden Fehlgeschmack auf. Dieser wurde nachfolgend in handelsüblichen Produkten charakterisiert. Weiterhin fanden strukturanalytische Verfahren zur Identifizierung der Fehlgeschmackskomponenten Anwendung.

4.1 Geschmacksprofilanalyse eines Referenzerbsenproteinisolats

Zunächst wurde eine Geschmacksprofilanalyse (vgl. 6.2.2) eines handelsüblichen Erbsenproteinisolats durchgeführt. Dadurch sollte beispielhaft die Ausprägung des Fehlgeschmacks verdeutlicht werden. Weiterhin ermöglicht das so ermittelte Geschmacksprofil weitere vergleichende Bewertungsmethoden.

Dazu wurden 6 g des Erbsenproteinisolats Nutralys S85F 5006541 (siehe 6.1.1) mit 100 ml mineralstoffarmen Evian®-Wasser (pH=5,5) versetzt und mittels eines Magnetrührwerks kontinuierlich aufgeschlämmt. Die sensorisch geschulten Panelisten wurden gebeten die Geschmacksqualitäten süß, sauer, umami, salzig und bitter sowie die organoleptischen Sinneseindrücke adstringierend und brennend auf einer unlinierten Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) zu bewerten. Abbildung 4-1 zeigt das Profil des Erbsenproteinisolats Nutralys S85F 5006541.

Attribut	MW±CV
süß	1,3±0,2
sauer	0,7±0,1
umami	0,7±0,1
salzig	0,5±0,1
bitter	1,4±0,1
adstringierend	1,1±0,1
brennend	0,4±0,1

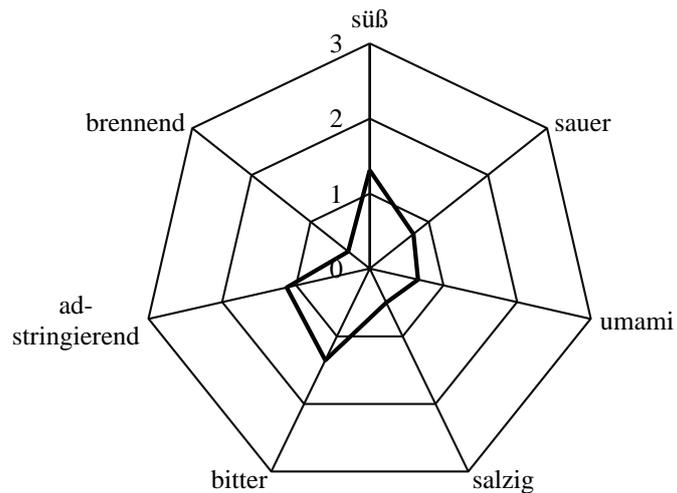


Abbildung 4-1: Geschmacksprofil des Erbsenproteinisolats Nutralys S85F 5006541 (MW±CV; $\alpha = 0,05$; $n = 25$).

Die Panelisten gaben mittlere Intensitäten für die Attribute bitter ($1,4 \pm 0,1$), adstringierend ($1,1 \pm 0,1$) und süß ($1,3 \pm 0,2$) an. Mit der durchgeführten Geschmacksprofilanalyse konnte demnach der bekannte bitter-adstringierende Fehlgeschmack von Erbsenproteinisolaten verdeutlicht werden.

4.2 Einfluss des pH-Werts auf das Geschmacksprofil von Erbsenproteinisolaten

Nachfolgend sollte ermittelt werden, ob und inwieweit der pH-Wert einen Einfluss auf den bitter-adstringierenden Fehlgeschmack von Erbsenproteinisolaten ausübt. Dazu wurde eine vergleichende Geschmacksprofilanalyse des Isolats Nutralys S85F 5006541 bei pH-Werten zwischen 3,5 und 7,5 durchgeführt (vgl. 6.2.3). Dieser pH-Bereich wurde als repräsentativ für die Einsatzmöglichkeiten in unterschiedlichen Lebensmittelmatrixen erachtet. Als Referenz diente eine Probenlösung mit einem pH-Wert von 5,5. Die in 4.1 ermittelten Intensitäten wurden den Panelisten bei der Ermittlung der Geschmacksprofile (siehe Abbildung 4-2) als Vergleich vorgegeben.

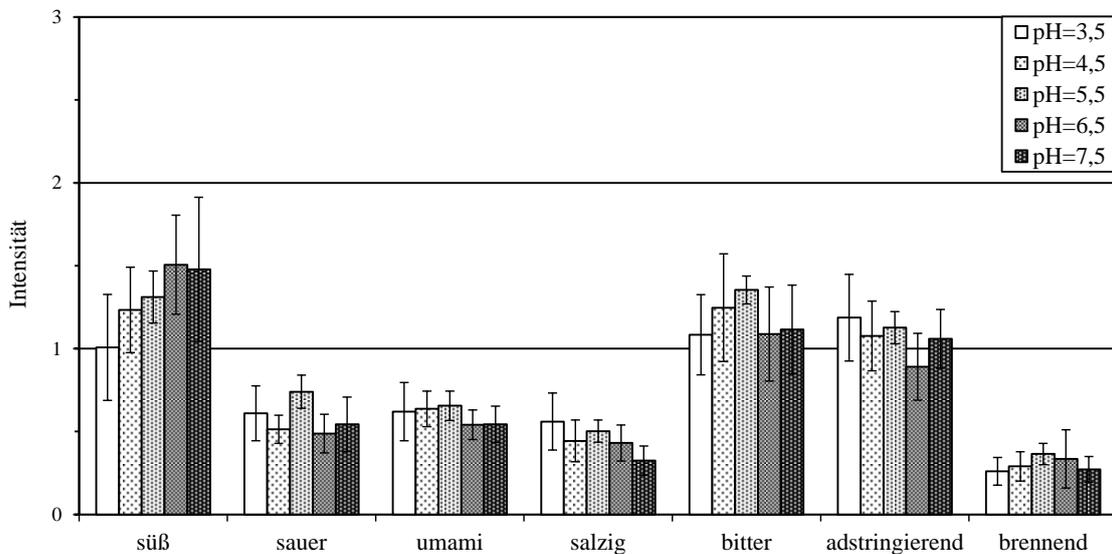


Abbildung 4-2: Einfluss des pH-Werts auf das Geschmacksprofil des Erbsenproteinisolats Nutralys S85F 5006541 (MW±CV; $\alpha = 0,05$; $n = 23$).

Tendenziell wurde nur die Süßintensität vom pH-Wert beeinflusst. Dabei bewertete das Panel mit steigender Basizität die Proben als süßer. Die Attribute bitter und adstringierend waren nur in geringem Maße vom pH-Wert abhängig. Für nachfolgende analytische und sensorische Tests wurde daher der bislang eingestellte pH-Wert von 5,5 (vgl. 4.1) beibehalten.

4.3 Geschmacksprofilanalysen handelsüblicher Erbsenproteinisolate

Weitere vier handelsübliche Erbsenproteinisolate (vgl. 6.1.1) wurden mittels vergleichender Geschmacksprofilanalyse (vgl. 6.2.3) untersucht. Es sollte herausgefunden werden, bei welchem Produkt der Fehlgeschmack am deutlichsten ausgeprägt ist. Dieses eignet sich möglicherweise am besten zur Strukturaufklärung und Isolierung der Geschmacksstimuli. Die Panelisten wurden im Versuch gebeten jede Probe mit der Referenz Nutralys S85F 5006541 (vgl. 4.1) zu vergleichen und anschließend in Bezug auf ihre Geschmacksintensitäten zu bewerten. Auf diese Weise konnten die Geschmacksprofile von weiteren vier handelsüblichen Erbsenproteinisolaten ermittelt werden (siehe Abbildung 4-3).

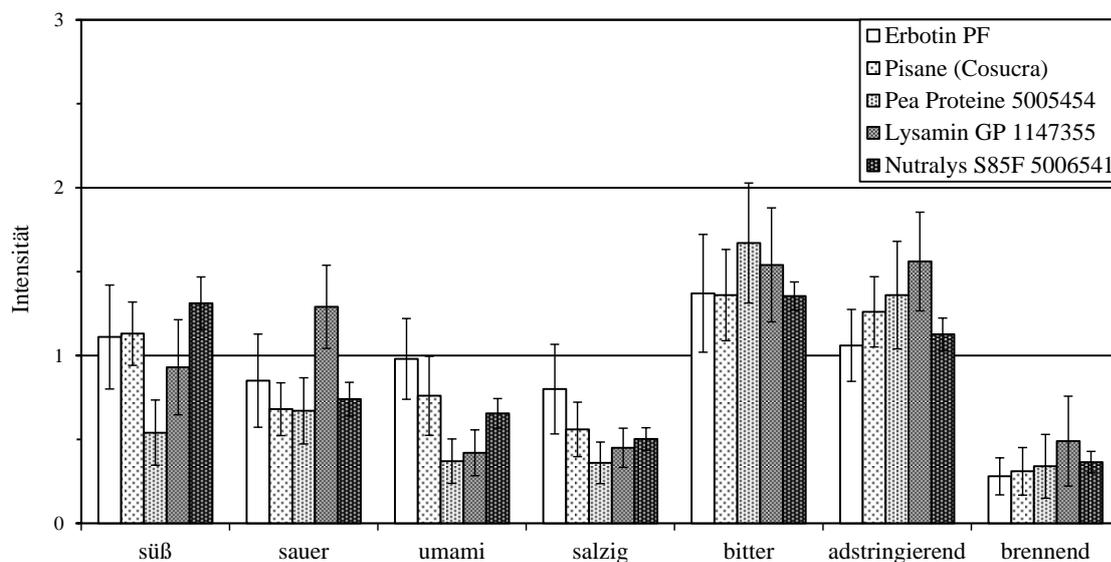


Abbildung 4-3: Vergleich der Geschmacksprofile handelsüblicher Erbsenproteinisolate ($MW \pm CV$; $\alpha = 0,05$; $n = 15$).

Die Geschmacksprofile der Erbsenproteinisolate unterschieden sich nur geringfügig. Die Panelisten gaben für die Proben mittlere Intensitäten in den Geschmacksattributen bitter (zwischen 1,4 und 1,7) und adstringierend (zwischen 1,1 und 1,6) an. Abgesehen vom Pea Protein 5005454 wurden für alle Proben mittlere Süßintensitäten im Bereich zwischen 0,9 und 1,3 angegeben. Das Pea Proteine 5005454 wurde im direkten Vergleich als bitterste Probe (1,7) beschrieben. Möglicherweise maskierten süße Geschmackskomponenten die Bitterkeit. Deswegen wurde die Probe Pea Proteine 5005454 für alle weiteren Extraktions- und Identifizierungsverfahren ausgewählt.

4.4 Aktivitätsorientierte Fraktionierung und Identifizierungsexperimente

Zur Lokalisierung und Identifizierung möglicher nichtflüchtiger Fehlgeschmacksstoffe in Erbsenproteinisolaten wurde das bitterste Erbsenproteinisolat (Pea Proteine 5005454 aus 4.3) Fraktionierungsexperimenten unterzogen und die gewonnenen Extrakte und der unlösliche Rückstand sensorisch und analytisch untersucht.

4.4.1 Sequentielle Lösungsmittlextraktion

Es wurde angenommen, dass die Fehlgeschmackstoffe durch molekulare Wechselwirkungen am pflanzlichen Proteinisolat anhaften. Um diese vom Protein abtrennen zu können, wurde eine sequentielle Lösungsmittlextraktion durchgeführt. Dabei wurde das Isolat, wie unter 6.3 erläutert, aufgearbeitet.

Es wurden 340 g der Probe je drei Mal mit Lösungsmitteln (je 1400 ml) verschiedener Polaritäten unter ständigem Rühren in einem Becherglas (5000 ml) extrahiert und anschließend filtriert. Verwendete Extraktionsmittel waren MeOH/Wasser (I), MeOH (II), MeOH/Aceton (III), Ethylacetat (IV) und Pentan (V). Dadurch sollten möglichst viele Substanzen unterschiedlicher Polaritäten erfasst werden. Auf diese Weise wurden fünf Extrakte (I bis V) und ein Extraktionsrückstand gewonnen (Abbildung 4-4). Die Extrakte wurden anschließend vom Lösungsmittel befreit und lyophilisiert. Der Extraktionsrückstand wurde ebenfalls nach Zugabe von Reinstwasser zweifach gefriergetrocknet. Die Ausbeuten sind Anhang A.1 zu entnehmen.

Die so gewonnen Extrakte sowie der unlösliche Rückstand wurden anschließend sensorisch evaluiert.

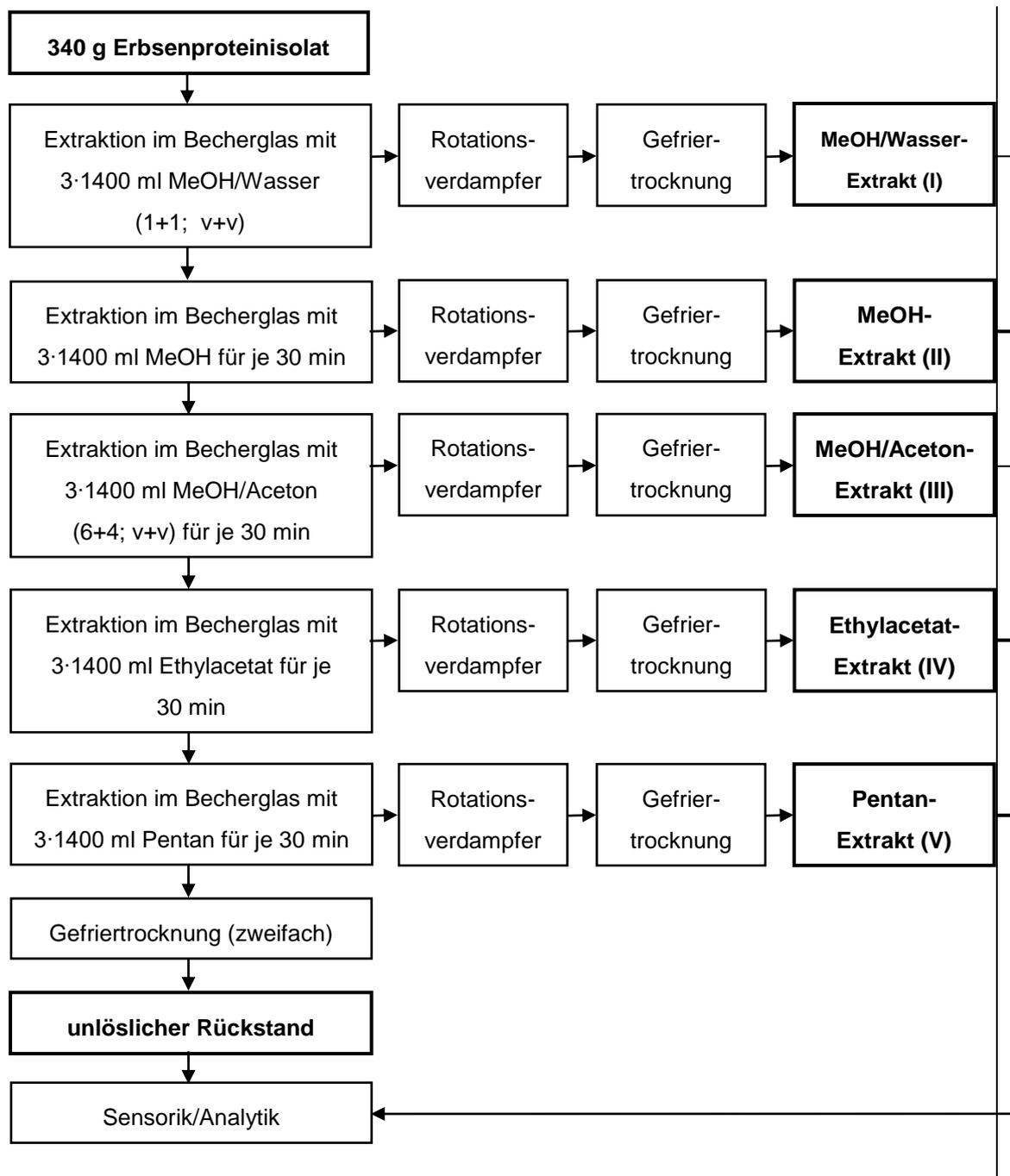


Abbildung 4-4: Verlaufsschema der sequentiellen Lösungsmittelextraktion des Erbsenproteinisolats.

4.4.2 Sensorische Beurteilung des unlöslichen Rückstands

Zur Ermittlung der Restbitterkeit des unlöslichen Extraktionsrückstandes wurde ein 3-AFC-Test (6.2.4.1) durchgeführt und ein Konsenspanel (6.2.4.2) befragt.

4.4.2.1 3-AFC-Test

Bei dem 3-AFC-Test wurden den Panelisten drei Proben in zufälliger Anordnung zur Verkostung bereitgestellt. Zwei davon enthielten den unlöslichen Rückstand und die andere das unbehandelte Erbsenproteinisolat. Im ersten Durchlauf der Doppelbestimmung erkannten 7 von 11 Panelisten das Isolat als das bitterere im Vergleich zum Rückstand. Beim zweiten Durchlauf waren es 11 von 15 Panelisten. Somit ist das Proteinisolat mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,001$ (*Busch-Stockfisch, 2008*) bitterer als der Rückstand.

4.4.2.2 Konsenspanel

Im Konsenspanel wurden fünf sensorisch geschulte Panelisten gebeten, die Bitterkeit des unbehandelten Erbsenproteinisolats mit der des unlöslichen Rückstandes zu vergleichen. Alle Panelisten bewerteten den Rückstand als weniger bitter im Vergleich zum Ausgangsprodukt. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des 3-AFC-Tests (vgl. 4.4.2.1).

Für alle weiteren Tests konnte somit davon ausgegangen werden, dass durch die sequentielle Lösungsmittlextraktion (vgl. 4.4.1) der überwiegende Teil der bitteren Fehlgeschmackstoffe abgetrennt wurde.

4.4.3 Sensorische Beurteilung der Extrakte I bis V

Um herauszufinden, welcher Extrakt geschmacklich am potentesten ist, wurde eine vergleichende Geschmacksprofilanalyse nach 6.2.3.3 durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Geschmacksprofil des MeOH/Wasser-Extraktes (I) bestimmt und den Panelisten als Referenz vorgegeben. Diese bewerteten anschließend die Geschmacksattribute im Vergleich. Auf diese Weise wurden die Geschmacksprofile der übrigen Extrakte II bis V ermittelt (siehe Abbildung 4-5).

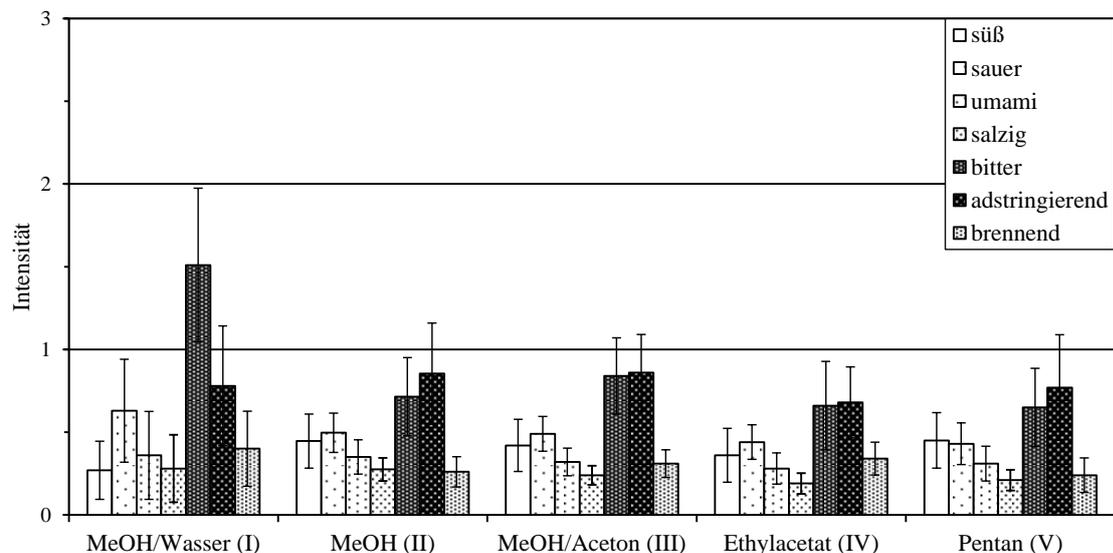


Abbildung 4-5: Vergleichende sensorische Bewertung der Extrakte (I bis IV) aus dem Erbsenproteinisolat Pea Proteine 5005454 (MW±CV; $\alpha=0,05$; $n=14$) mit dem MeOH/Wasser-Extrakt als Referenz (MW±CV; $\alpha = 0,05$; $n = 12$).

Das Panel bewertete den Extrakt I als den bittersten ($1,5\pm0,5$). Hinsichtlich der Adstringenz unterschieden sich alle Extrakte nur geringfügig. Da die bitteren Fehlgeschmackstoffe insbesondere in Extrakt I lokalisiert wurden, wurde dieser nachfolgend aktivitätsorientiert weiter fraktioniert.

4.4.4 MPLC-ELSD/Geschmacksverdünnungsanalyse des Extraktes I

Nachdem der Extrakt I als geschmacklich potentester identifiziert wurde (vgl. 4.4.3), sollte dieser nun mittels MPLC-ELSD fraktioniert werden (vgl. 6.4.1). Auf diese Weise sollten vom Extrakt nicht- beziehungsweise weniger geschmacksaktive Substanzen abgereichert werden. Dabei wurde der Extrakt I in 13 weitere Fraktionen (I-1 bis I-13) aufgetrennt. Der Elutionsgradient wurde so gewählt, dass der MeOH-Anteil 6 min lang konstant blieb und sich dann stufenweise um 10% erhöhte. Auf diese Weise lässt sich die Polarität der einzelnen Fraktionen abschätzen. Alle Fraktionen wurden anschließend am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und nach Zugabe von Reinstwasser gefriergetrocknet und gewogen. Die ermittelten Ausbeuten befinden sich in Anhang 0.

Die Fraktionen wurden anschließend auf ihre Geschmacksaktivität getestet. Dabei fand die von *Frank et al. (2001)* etablierte Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) Anwendung. Dazu wurden die Fraktionen entsprechend der vierfachen natürlichen Konzentration in Evian® (pH=5,5) aufgenommen und je ein Aliquot stufenweise 1+1 verdünnt. Die Panelisten verkosteten dann die Verdünnungsreihe in aufsteigender Konzentration im Duo-Test gegen Evian® (pH=5,5) als Blindwert. Aus der Verdünnungsstufe, ab der kein Unterschied mehr zum Blindwert festgestellt werden konnte, berechnet sich der Geschmacksverdünnungsfaktor (GV-Faktor) nach 6.2.5. Der GV-Faktor ist proportional zur Geschmacksaktivität der Fraktionen.

Vom Panel wurden dadurch eine saure und zwölf bittere Fraktionen ermittelt (siehe Abbildung 4-6).

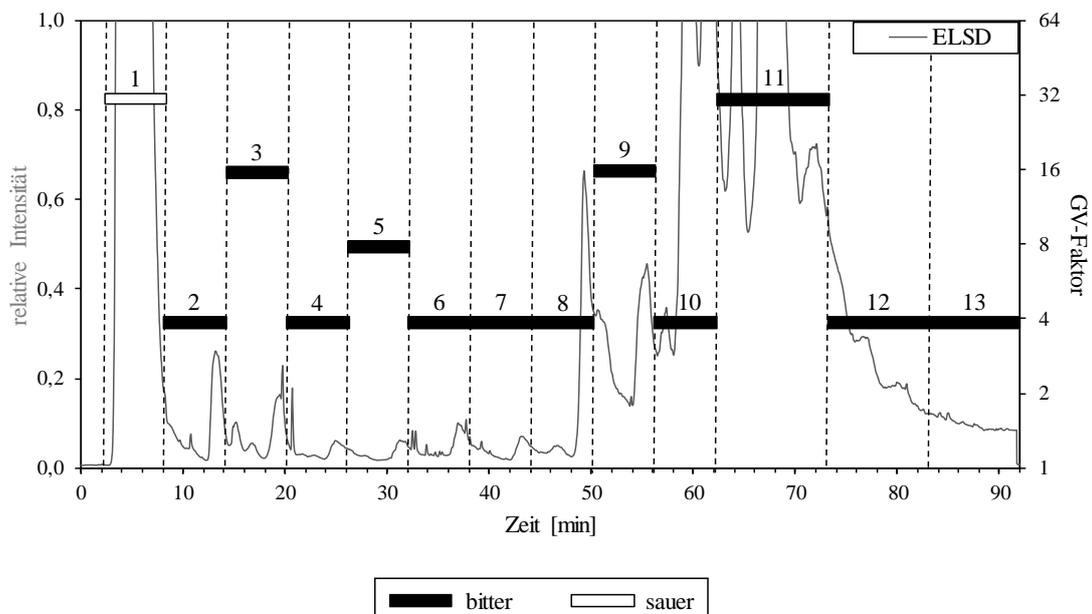


Abbildung 4-6: MPLC-ELSD-Chromatogramm von Extrakt I mit den entsprechenden GV-Faktoren der Fraktionen I-1 bis I-13 (n≤11).

Für die Fraktionen I-1 und I-11 wurden die höchsten GV-Faktoren von 32 ermittelt. Das Panel beschrieb I-1 als sauer und I-11A als bitter. I-1 wurde daher für weitere sensorische und analytische Experimente außer Acht gelassen. Fraktion I-11 hingegen wurde für weitere Aufarbeitungsversuche herangezogen.

4.4.5 Präparative HPLC-ELSD/Geschmacksverdünnungsanalyse von Fraktion I-11

Da das Panel Fraktion I-11 als bitterste beschrieben (vgl. 4.4.4), wurden die Fehlgeschmackstoffe in dieser Fraktion vermutet. Es wurde daher eine weitere Subfraktionierung mittels präparativer HPLC-ELSD (vgl. 6.4.2) durchgeführt, um nicht-beziehungsweise weniger geschmacksaktive Verbindungen abzutrennen. Zunächst wurde dazu eine geeignete HPLC-Methode entwickelt. So gelang die Auftrennung in weitere 17 Subfraktionen (I-11-1 bis I-11-17).

Die Subfraktionen wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, gefriergetrocknet und gewogen. Um festzustellen, welche der Subfraktionen geschmacksaktive Verbindungen enthalten, wurde erneut eine Geschmacksverdünnungsanalyse (GVA) nach *Frank et al. (2001)* durchgeführt (vgl. 6.2.5). Dazu wurden die Subfraktionen direkt in 40 ml Evian® (pH=5,5) aufgenommen und stufenweise 1+1 verdünnt. Die Panelisten verkosteten dann diese Verdünnungsreihe im Duo-Test gegen Evian® (pH=5,5). Auf diese Weise konnten die GV-Faktoren der Subfraktionen ermittelt werden. Abbildung 4-7 zeigt das HPLC-ELSD-Diagramm mit entsprechenden GV-Faktoren der Subfraktionen:

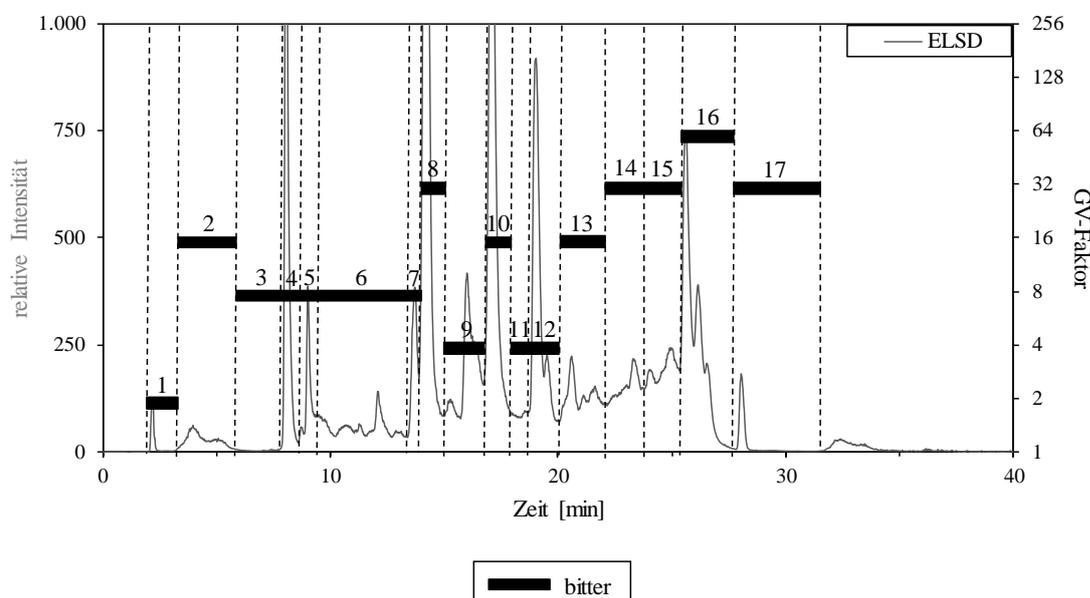


Abbildung 4-7: HPLC-ELSD-Chromatogramm von Fraktion I-11 mit den entsprechenden GV-Faktoren der Subfraktionen I-11-1 bis I-11-17 ($n \leq 10$).

Das Panel beschrieb die höchste Bitterintensität für die Subfraktion I-11-16 mit einem GV-Faktor von 32. Weiterhin wurden für die Subfraktionen I-11-8, I-11-14, I-11-15 und I-11-17 ein GV-Faktor von 16 bestimmt. Die so gewonnenen Subfraktionen wurden anschließend mittels semipräparativer HPLC erneut fraktioniert und anschließend die Struktur der enthaltenen Bitterstoffe mit Hilfe von MS- und NMR-Experimenten identifiziert.

4.4.6 Isolierung und Strukturaufklärung der geschmacksaktiven Substanzen aus Subfraktion I-11-16

Da für die Subfraktion I-11-16 der höchste TD-Faktor aller Subfraktionen von 64 ermittelt wurde (vgl. 4.4.5), sollte diese nun final mittels semipräparativer HPLC aufgetrennt werden. Die so gewonnenen Substanzen wurden anschließend mittels NMR-Spektroskopie (vgl. 6.6) und massenspektrometrischer Experimente (vgl. 6.5) identifiziert. Zur Auftrennung der Subfraktion wurde zunächst eine geeignete Trennmethode entwickelt (vgl. 6.4.3, Trennsystem 1). Das entsprechende HPLC-ELSD-Diagramm ist Abbildung 4-8 zu entnehmen.

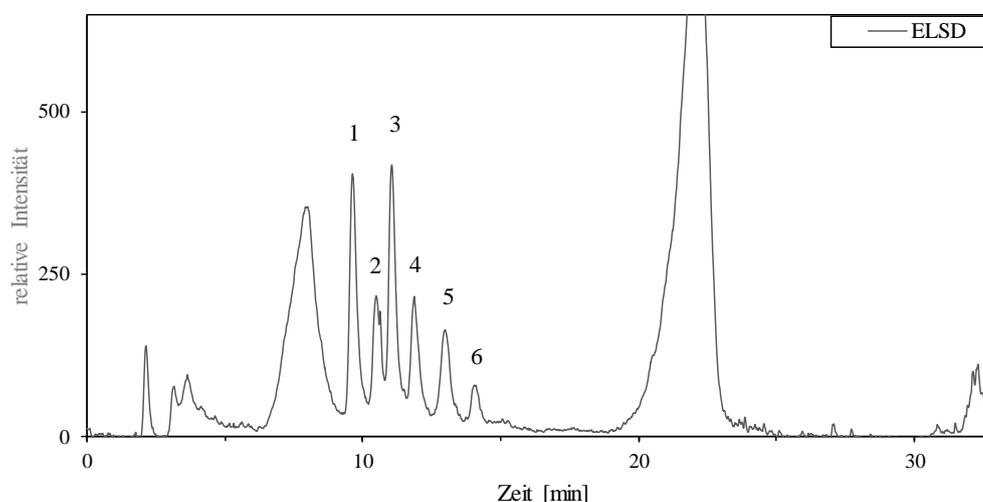


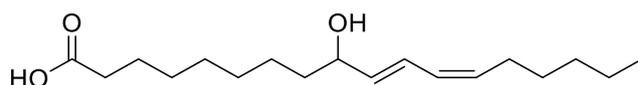
Abbildung 4-8: HPLC-ELSD-Chromatogramm von Subfraktion I-11-16 mit den Peaks I-11-16-1 bis I-11-16-6.

In Fraktion I-11-16 konnten die Peaks I-11-16-1 bis I-11-16-6 aufgeklärt werden. Bei den Peaks mit der Retentionszeit von $t_R = 7$ min und $t_R = 2$ min handelt es sich vermutlich um komplexe Stoffgemische, die chromatographisch nicht trennbar sind. UHPLC-ToF-MS-

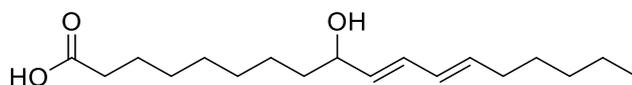
Messungen und NMR-Experimente bestätigten diese Annahme (Daten nicht dargestellt). Die Strukturaufklärung aller anderen Verbindungen ist nachfolgend dargelegt.

4.4.6.1 I-11-16-1 – Isomere von 9-HODE und 13-HODE

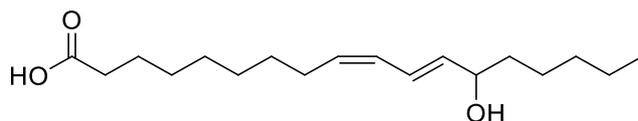
Bei Fraktion I-11-16-1 handelt es sich um ein Isomerengemisch von Hydroxyoctadecadiensäuren (siehe Abbildung 4-9). So konnten die beiden Isomere der 13-Hydroxyoctadeca-9,11-diensäure (13-HODE) nachgewiesen werden: (9Z,11E)-13-Hydroxyoctadeca-9,11-diensäure und (9E,11E)-13-Hydroxyoctadeca-9,11-diensäure. 9-Hydroxyoctadeca-10,12-diensäure (9-HODE) konnte ebenfalls identifiziert werden. Zum derzeitigen Kenntnisstand ist es jedoch nicht möglich eine Aussage zu treffen, ob (10E,12Z)-9-Hydroxyoctadeca-10,12-diensäure sowie (10E,12E)-9-Hydroxyoctadeca-10,12-diensäure oder nur eins der Isomere präsent ist.



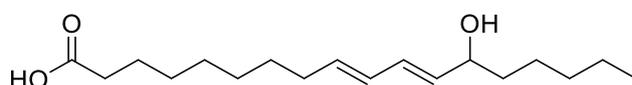
(10E,12Z)-9-Hydroxyoctadeca-10,12-diensäure



(10E,12E)-9-Hydroxyoctadeca-10,12-diensäure



(9Z,11E)-13-Hydroxyoctadeca-9,11-diensäure



(9E,11E)-13-Hydroxyoctadeca-9,11-diensäure

Abbildung 4-9: Strukturen der Isomere von 9-HODE und 13-HODE.

Bei Untersuchungen mittels UHPLC-ToF-MS (siehe 6.5.1) konnten zwei Peaks ($t_R = 1,96$ min und $t_R = 2,08$ min) mit gleichem Masse-Ladungsverhältnis von $m/z = 295,23$

detektiert werden (siehe Abbildung 4-10). Für diese wurde jeweils die Elementarzusammensetzung $C_{18}H_{32}O_3$ berechnet.

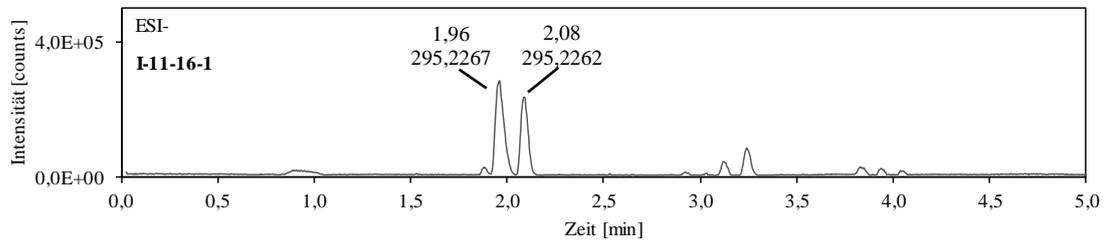


Abbildung 4-10: UHPLC-ToF-MS-Chromatogramm von I-11-16-2 im negativen Ionisierungsmodus.

In den so generierten Massenspektren konnten charakteristische Fragmentierungen für Hydroxyoctadecadiensäuren beobachtet werden. Nach *Murphy (2015)* spalten sich die Kohlenstoffkette von 9-HODE und 13-HODE zwischen dem Diensystem und der Hydroxyfunktion. Dadurch entstehen die charakteristischen Fragmente von $m/z = 171$ (9-HODE) und $m/z = 195$ (13-HODE) (vgl. Abbildung 4-11).

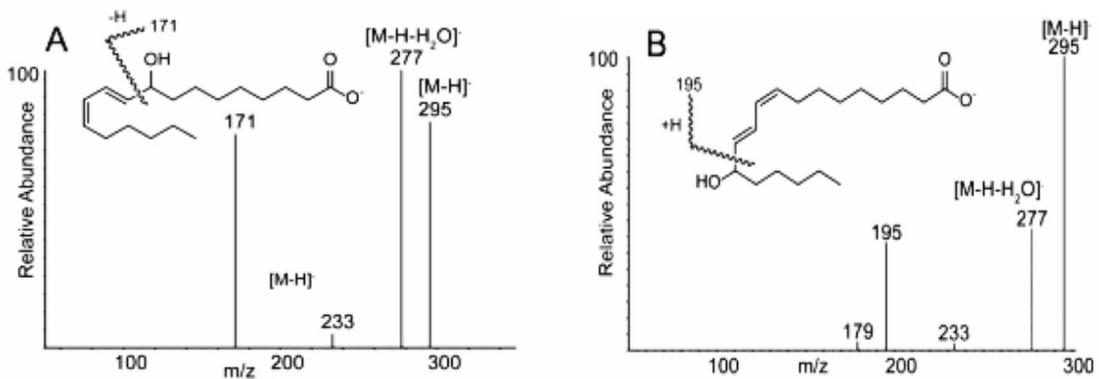


Abbildung 4-11: Fragmentierung von 9-HODE (links) und 13-HODE (kopiert aus *Murphy, 2015*).

Im Massenspektrum des Peaks mit der Retentionszeit von $t_R = 1,96$ min sind dabei sowohl das Fragment $m/z = 171$ als auch das Fragment $m/z = 195$ mit geringer Intensität zu beobachten. Das Massenspektrum des zweiten Peaks ($t_R = 2,08$ min) hingegen enthält nur das Fragment $m/z = 171$. Im ersten Peak ($t_R = 1,96$ min)

können somit Isomere von 9-HODE und 13-HODE vermutet werden, wohingegen der zweite Peak ($t_R = 2,08$ min) nur Hinweise auf 9-HODE liefert.

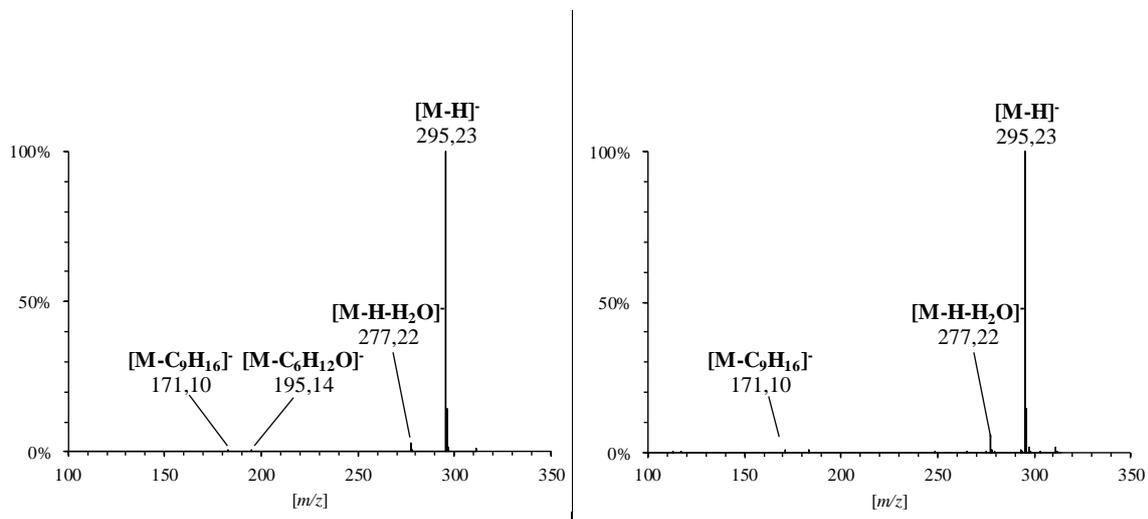


Abbildung 4-12: Massenspektrum von Peak 1 ($t_R = 1,96$ min) und Peak 2 ($t_R = 2,08$ min) des UHPLC-ToF-MS-Chromatogramms von 7-I-11-16-1

Da die ESI-Ionisierung der UHPLC-ToF-MS nur geringe Signalintensitäten lieferte, wurden ebenfalls MS/MS-Spektren mit dem Präparat I-11-16-2 generiert. Die Probe wurde dabei ohne chromatographische Vortrennung direkt ins System injiziert (vgl. 6.5.2). Gemessen wurde zunächst im *Full-Screen*-Modus. Die Analytation mit dem Masse-Ladungsverhältnis von $m/z = 295$ wurde anschließend gezielt fragmentiert. Eine Unterscheidung der Isomere war mit diesem Experiment somit nicht möglich. Jedoch sind im Massenspektrum deutlich die charakteristischen Fragmente von 9-HODE und 13-HODE zu beobachten (siehe Abbildung 4-13).

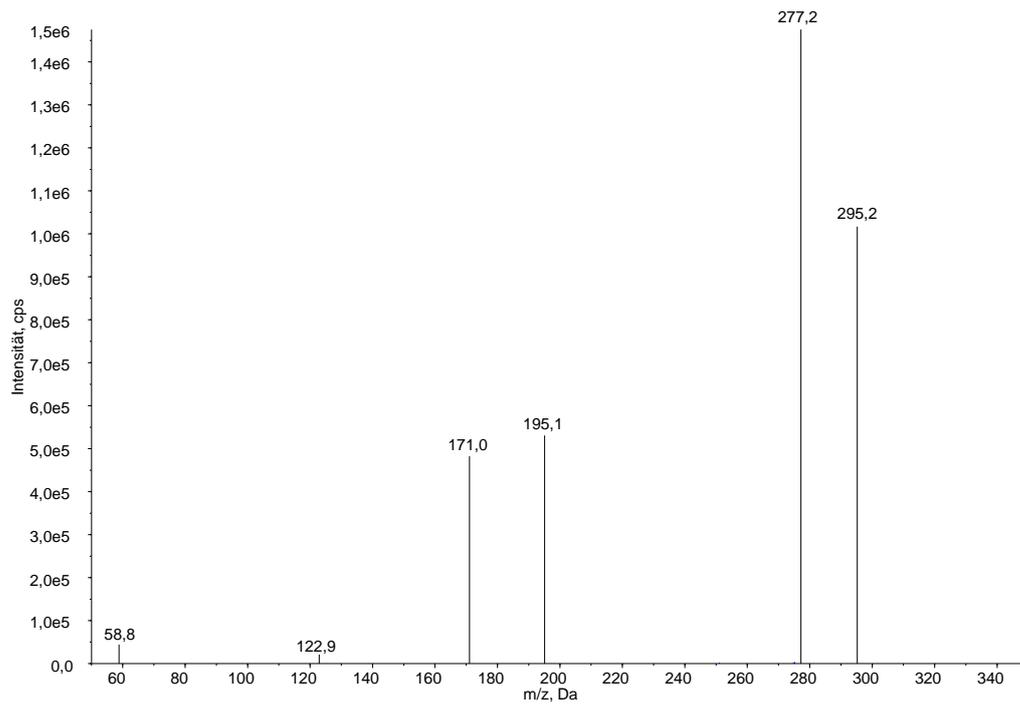


Abbildung 4-13: MS/MS-Spektrum des Analytens $m/z = 295$ von I-11-16-2.

Mittels NMR-Experimenten (siehe 6.6) wurde bestätigt, dass 9-HODE- und 13-HODE-Isomere im Präparat vorliegen. Dies war durch spezifische Kopplungen im H2BC-Experiment möglich. Charakterisch ist dabei die Hydroxygruppe in direkter Nachbarschaft zum Diensystem (siehe Abbildung 4-14). Da im Präparat mehrere Konfigurationsisomere vorliegen, war es nicht möglich durch Berechnung der Kopplungskonstanten Aussagen über die Anwesenheit bestimmter *cis-trans*-Isomere zu treffen.

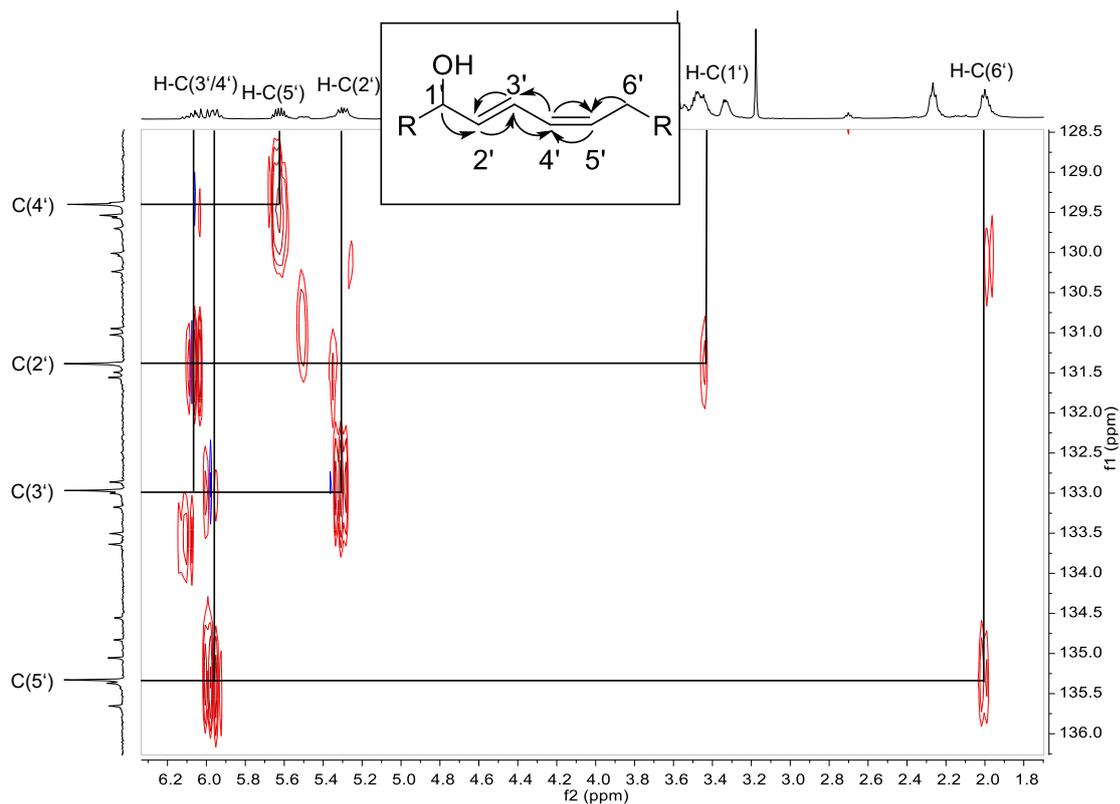


Abbildung 4-14: Ausschnitt des H2BC-Spektrums von I-11-16-2 im Bereich des Diensystems in direkter Nachbarschaft zur Hydroxygruppe.

Um herauszufinden, welche Konfigurationsisomere von 9-HODE und 13-HODE vorliegen, wurden kommerzielle Standards von (10*E*,12*Z*)-9-Hydroxyoctadeca-10,12-diensäure, (10*E*,12*E*)-9-Hydroxyoctadeca-10,12-diensäure, (9*Z*,11*E*)-13-Hydroxyoctadeca-9,11-diensäure und (9*E*,11*E*)-13-Hydroxyoctadeca-9,11-diensäure erworben und diese erneut mittels UHPLC-ToF-MS gemessen (siehe Abbildung 4-15). Durch Vergleich der Retentionszeiten und der Massenspektren sollten so herausgefunden werden, welche der Isomere in I-11-16 vorhanden sind.

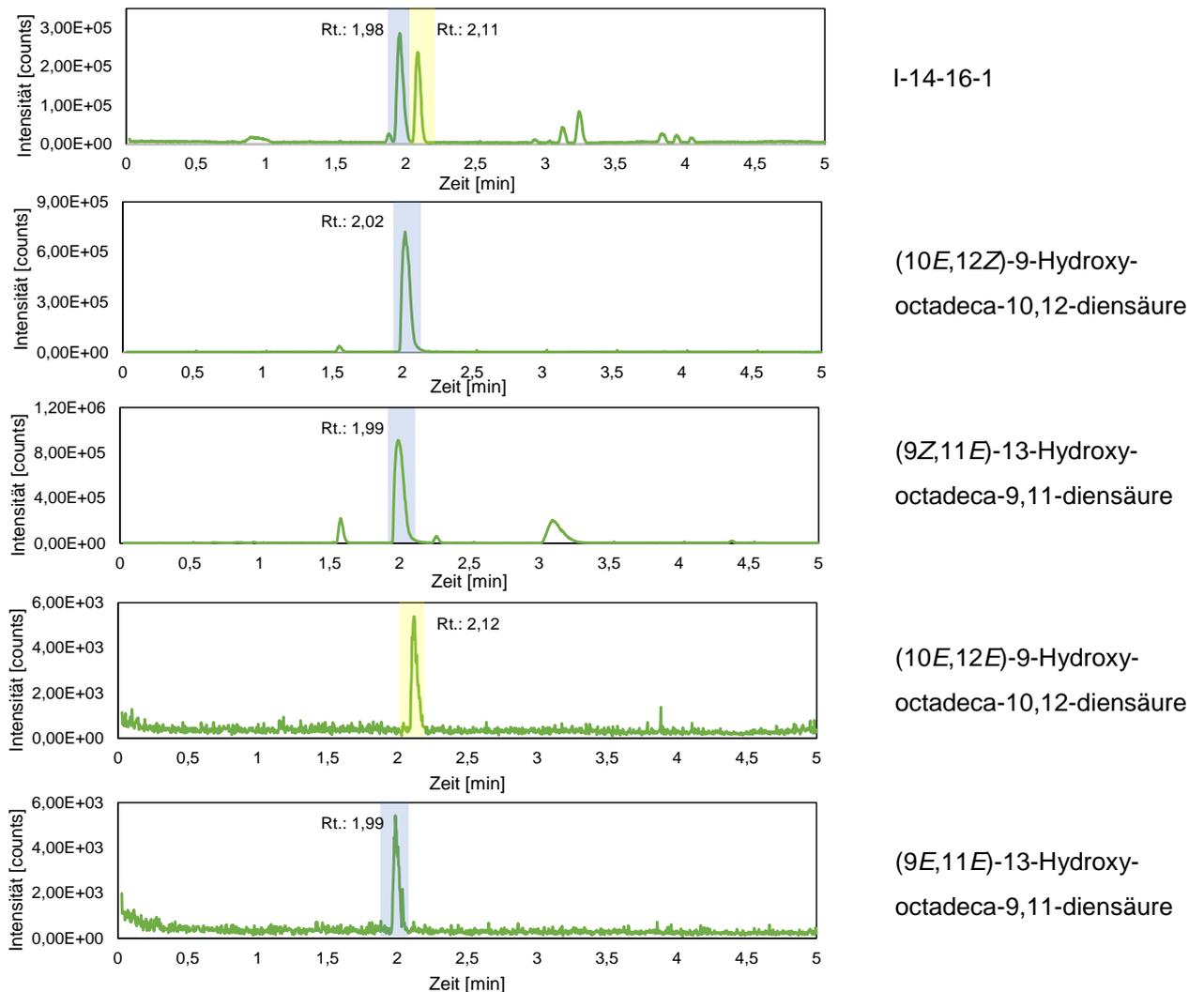


Abbildung 4-15: UHPLC-ToF-MS-Chromatogramme von I-11-16-1 im Vergleich zu (10*E*,12*Z*)-9-Hydroxy-octadeca-10,12-diensäure, (9*Z*,11*E*)-13-Hydroxy-octadeca-9,11-diensäure, (10*E*,12*E*)-9-Hydroxy-octadeca-10,12-diensäure und (9*E*,11*E*)-13-Hydroxy-octadeca-9,11-diensäure.

Aus dem Vergleich der Retentionszeiten ging hervor, dass es sich bei dem zweiten Peak ($t_R = 2,08$ min) um (10*E*,12*E*)-9-Hydroxy-octadeca-10,12-diensäure handelt. Die Massenspektren von Standard und Probe sind ebenfalls identisch. Die Anwesenheit von (10*E*,12*Z*)-9-Hydroxy-octadeca-10,12-diensäure konnte durch dieses Experiment ebenfalls nachgewiesen werden. Nur dieses Isomer eluiert gemeinsam mit Peak 1 und liefert Massenspektren mit dem charakteristischen Fragment $m/z = 171$. Einzig die Unterscheidung zwischen (9*E*,11*Z*)-13-Hydroxy-octadeca-9,11-diensäure und (9*E*,11*E*)-13-Hydroxy-octadeca-9,11-diensäure ist bislang noch nicht möglich. Beide Isomere eluieren zur gleichen Retentionszeit und generieren Massenspektren mit dem charakteristischen Fragment $m/z = 195$. Es können demnach nur eines oder beide Isomere in I-11-16-1 vorhanden sein.

4.4.6.2 I-11-16-2 – 1-Linoleoylglycerol

Verbindung I-11-16-2 konnte als 1-Linoleoylglycerol identifiziert werden (siehe Abbildung 4-16). Mittels UHPLC-ToF-MS-Experimente (siehe 6.5.1) konnte ein Pseudomolekülion $[M+Na]^+$ mit dem Masse-Ladungsverhältnis von $m/z = 377,2707$ detektiert werden. Daraus ließ sich die Summenformel $C_{21}H_{38}O_4Na$ des Natriumadduktes berechnen.

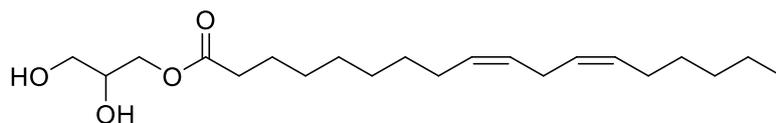


Abbildung 4-16: Struktur von 1-Linoleoylglycerol.

Mittels NMR-Experimenten (vgl. 6.6) konnte die Struktur bestätigt werden. Die Signale sind dabei in Übereinstimmung mit *Degenhardt (2012)*.

4.4.6.3 I-11-16-3 – Linolensäure

Bei der Verbindung I-11-16-3 handelt es sich um Linolensäure. Für dieses Präparat konnte durch UHPLC-ToF-MS-Experimente (siehe 6.5.1) die Strukturformel $C_{18}H_{30}O_2$ für das Ion $[M-H]^-$ mit dem Masse-Ladungsverhältnis von $m/z = 277,2154$ bestimmt werden.

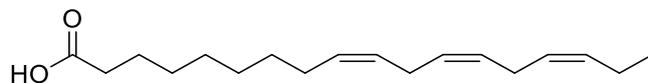


Abbildung 4-17: Struktur von Linolensäure.

In NMR-Experimenten (vgl. 6.6) konnte die Struktur bestätigt werden. Charakteristisch für Linolensäure ist dabei der Doppelbindungsbereich im ^{13}C -NMR (siehe Abbildung 4-18).

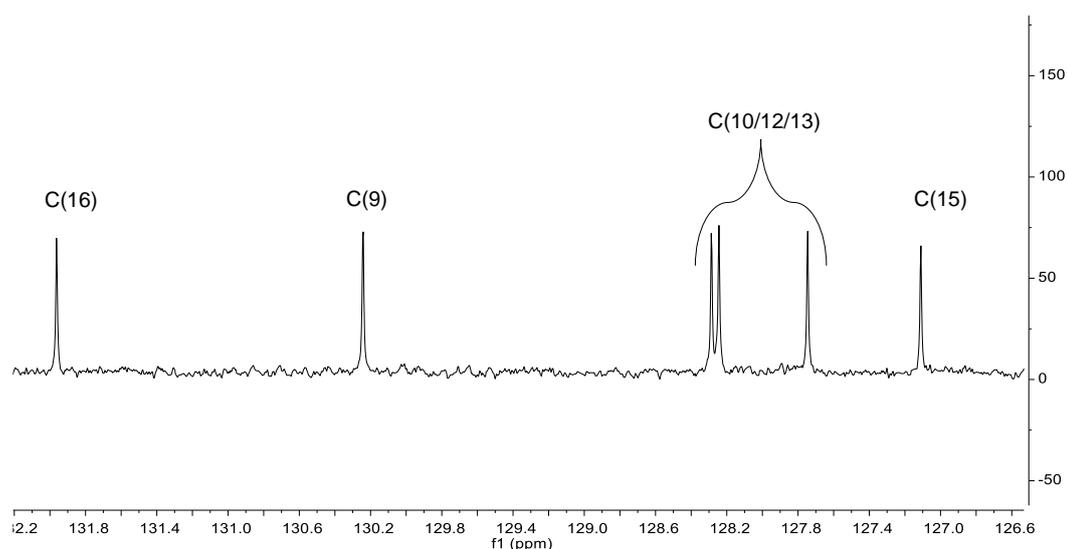


Abbildung 4-18: Doppelbindungsbereich im ^{13}C -NMR von I-11-16-3.

4.4.6.4 I-11-16-4 – 2-Hydroxypalmitinsäure

Bei Substanz I-11-16-4 handelt es sich um 2-Hydroxypalmitinsäure (vgl. Abbildung 4-19). Die Elementarzusammensetzung von $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_3$ des Pseudomoleküls mit $m/z = 271,2266$ im negativen Ionisierungsmodus stimmen mit dieser Verbindung überein.

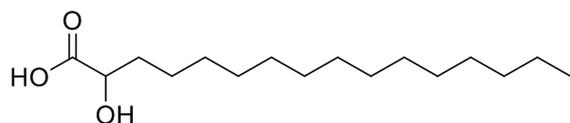


Abbildung 4-19: Struktur von 2-Hydroxypalmitinsäure.

Murphy (2015) beschreibt für 2-Hydroxypalmitinsäure charakteristische Fragmentierungsmuster. So weist die Anwesenheit des Fragments $m/z = 225$ deutlich auf die Verknüpfung der Hydroxygruppe an Position 2 der Kohlenstoffkette hin. Dieses Fragment konnte mit Hilfe von MS/MS-Experimenten (vgl. 6.5.2) nach Direktinjektion der Probe detektiert werden. Nachfolgend ist in Abbildung 4-20 das von *Murphy (2015)* beschriebene Fragmentierungsmuster im direkten Vergleich zu Präparat I-11-16-4 dargestellt. Das gemessene MS/MS-Spektrum ist dabei in Übereinstimmung mit der Literatur.

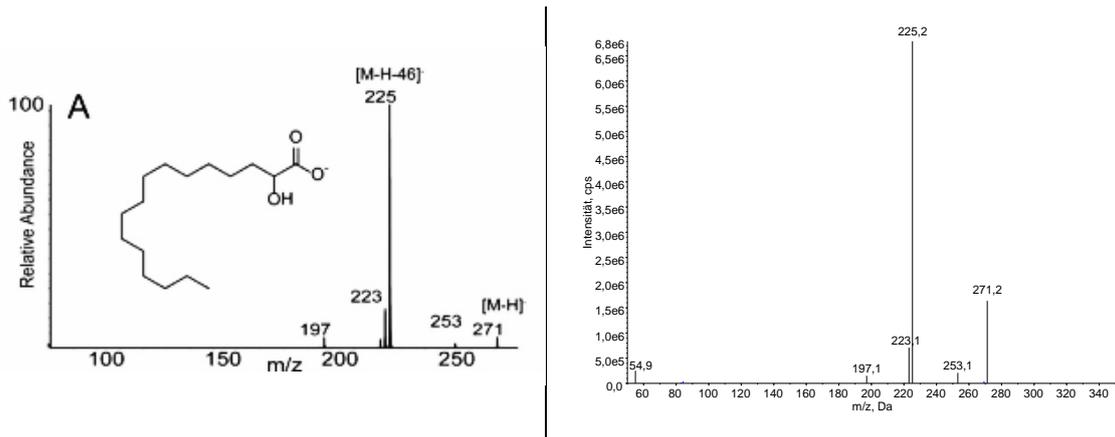


Abbildung 4-20: theoretische Fragmentierung von 2-Hydroxypalmitinsäure (links) (kopiert aus *Murphy, 2015*) und das erhaltene Massenspektrum von I-11-16-4 (rechts).

Nach Auswertung der NMR-Spektren (vgl. 6.6) konnte die Struktur bestätigt werden. Wichtige Hinweise auf die Hydroxygruppe an Position 2 der Kohlenstoffkette lieferte dabei das HMBC-Experiment (siehe Abbildung 4-21). Dabei ist eine Kopplung vom Carbonylkohlenstoff C(1) zum deutlich tieffeldverschobenen Proton H-C(2) erkennbar.

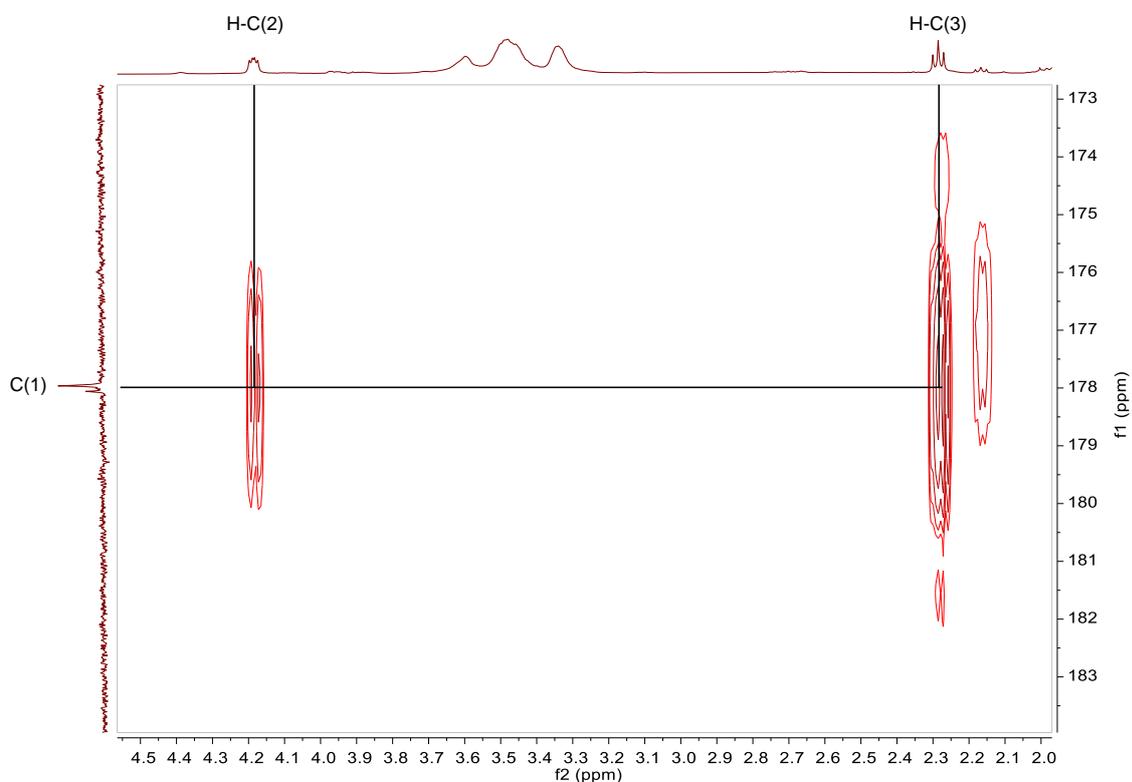


Abbildung 4-21: Bereich des Carbonylkohlenstoffatoms im HMBC-Spektrum von I-11-16-4.

4.4.6.5 I-11-16-5 – 2-Hydroxyölsäure

Verbindung I-11-16-5 (Abbildung 4-22) wurde als 2-Hydroxyölsäure identifiziert. Für dieses Präparat ließ sich im UHPLC-ToF-MS-Experiment (siehe 6.5.1) ein Pseudomolekülion mit dem Masse-Ladungsverhältnis von $m/z = 297,2434$ detektieren. Als Summenformel konnte $C_{18}H_{34}O_3$ berechnet werden.

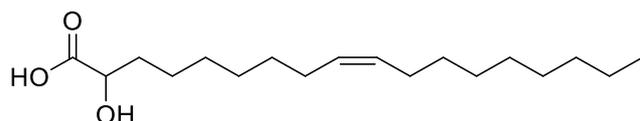


Abbildung 4-22: Struktur von 2-Hydroxyölsäure.

In NMR-Experimenten (vgl. 6.6) konnten weitere Hinweise auf die Position der Hydroxygruppe an Position 2 der Kohlenstoffkette erlangt werden. So konnten im HMBC-Spektrum Kopplungen vom Carbonylkohlenstoff C(1) zum tieffeldverschobenen Proton H-C(2) beobachtet werden.

Zur Verifizierung der Position der Hydroxyfunktion im Molekül wurde das Präparat silyliert (siehe 6.5.3.1). Durch diese Derivatisierung konnten in anschließenden GC-MS-Experimenten produktspezifische Fragmente detektiert werden, die Aufschluss über die Position der Hydroxygruppe geben. Das Massenspektrum mit den entsprechenden Fragmenten ist in Abbildung 4-23 dargestellt.

4.4.6.6 I-11-16-6 – Linolsäure

Bei Substanz I-11-16-6 handelt es sich um Linolsäure (siehe Abbildung 4-24). Mittels UHPLC-ToF-MS-Experimenten (siehe 6.5.1) wurde das Pseudomolekülion $[M-H]^-$ mit dem Masse-Ladungsverhältnis von $m/z = 279,2315$ detektiert. Somit konnte eine Elementarzusammensetzung von $C_{18}H_{32}O_2$ berechnet werden.

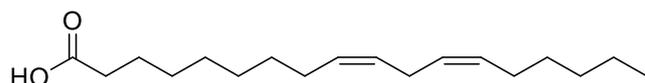


Abbildung 4-24: Struktur von Linolsäure.

Nach Auswertung der generierten NMR-Spektren (vgl. 6.6) konnte die Struktur für I-11-16-6 bestätigt werden.

4.4.7 Isolierung und Strukturaufklärung der geschmacksaktiven Substanzen aus Subfraktion I-11-17

Für Subfraktion I-11-17 wurde mittels Geschmacksverdünnungsanalyse ein GV-Faktor von 32 ermittelt (vgl. 4.4.5). Die in dieser Fraktion enthaltenen Substanzen waren demnach ebenfalls als geschmacksaktiv einzustufen.

Nach chromatographischer Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC wurden die isolierten Verbindungen zur Strukturaufklärung mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden (siehe 6.5) und NMR-Spektroskopie (siehe 6.6) untersucht. Für die Isolierung konnte dabei dieselbe Methode wie für Subfraktion I-11-16 angewandt werden (vgl. 6.4.3, Trennsystem 1). Das zugehörige HPLC-Chromatogramm ist nachfolgend dargestellt (siehe Abbildung 4-25).

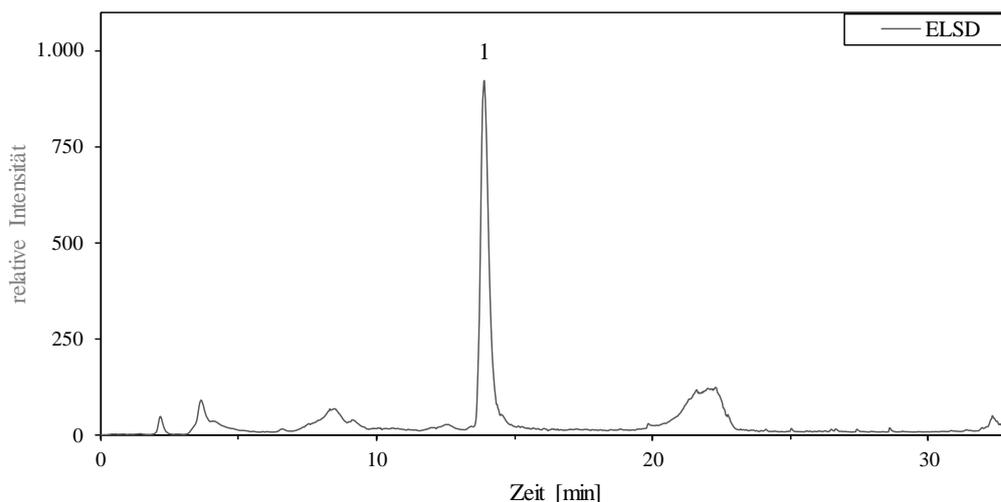


Abbildung 4-25: HPLC-ELSD-Chromatogramm von Subfraktion I-11-17 mit dem Peak I-11-17-1.

Für die isolierte Substanz I-11-17-1 konnte bislang nur ein Strukturvorschlag postuliert werden. Dieser beruht auf der Auswertung der NMR-Daten. Mittels der angewandten LC-MS-Methoden war es bislang nicht möglich verlässliche Angaben über die Elementarzusammensetzung und die molekulare Masse der Verbindung zu erhalten. Die Schlussfolgerungen, die zur vorgeschlagenen Substanz führen, sind nachfolgend dargelegt.

4.4.7.1 I-11-17-1 – Octacos-6,9,19,22-tetraen

Für das Präparat I-11-17-1 wird die Verbindung Octacos-6,9,19,22-tetraen postuliert (siehe Abbildung 4-26). Mittels UHPLC-ToF-MS- und MS-MS-Experimenten (siehe 6.5.1 und 6.5.2) konnte die theoretische Elementarzusammensetzung von $C_{28}H_{50}$ und die exakte Masse von 386,39 nicht bestätigt werden. Auch GC-MS-MS-Experimente lieferten keine validen Ergebnisse (Daten nicht dargestellt).

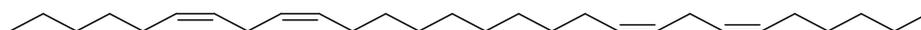


Abbildung 4-26: Struktur von Octacos-6,9,19,22-tetraen

Hinweise auf die postulierte Substanz lieferten jedoch NMR-Experimente (vgl. 6.6). So konnte durch Vergleich der 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von I-11-17-1 mit denen von Linolsäure die Übereinstimmung in mehreren Signalen beobachtet werden. Demnach sind

im ^{13}C -NMR die Signale von Position C(14) bis C(18) der Kohlenstoffkette mit denen von Linolsäure deckungsgleich. Die Signale C(1) bis C(4) fehlen jedoch zur vollständigen Übereinstimmung zu Linolsäure (siehe Abbildung 4-27). Im ^1H -NMR ließ sich das gleiche Ergebnis feststellen. Im Gegensatz zur Linolsäure waren nur für die Protonen H-C(2) und H-C(3) keine Signale zu beobachten. Das Proton H-C(4) der Linolsäure überlagert sich mit anderen Protonen im Molekül in einem Multipllett.

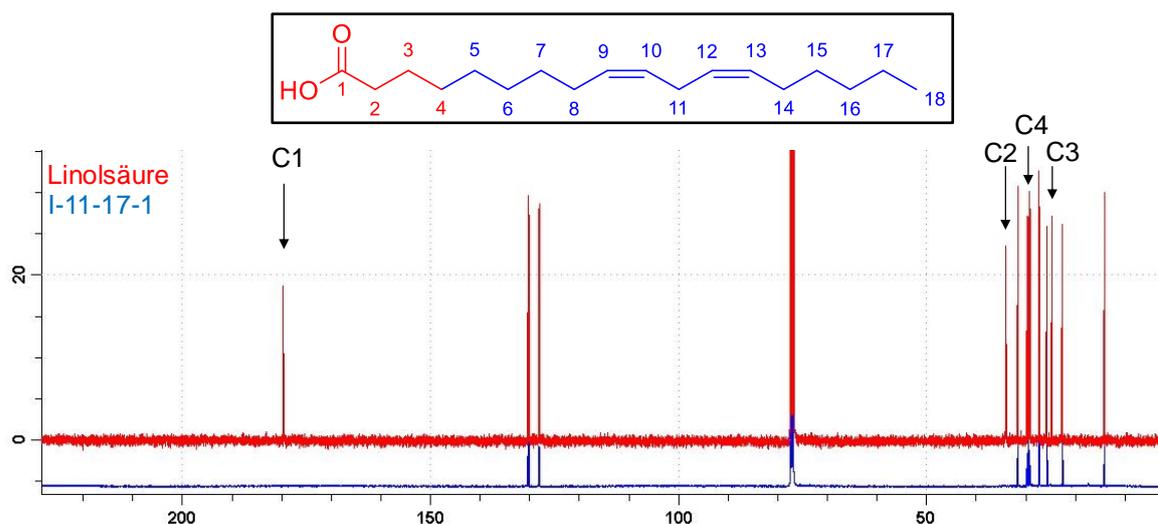


Abbildung 4-27: ^{13}C -NMR-Spektrum von Linolsäure (rot) im Vergleich zu I-11-17-1 (blau).

Substanz I-11-17 und Linolsäure stimmen demnach in 14 C-Atomen ihrer Kohlenstoffketten überein. Für die weitere Strukturaufklärung war jedoch von Bedeutung, ob das Molekül noch eine weitere endständige CH_3 -Gruppe besitzt oder womöglich eine andere funktionelle Gruppe am anderen Kettenende vorhanden ist. Ringschlüsse konnten aufgrund von fehlenden Signalen von tertiären oder quartären Kohlenstoffen im DEPT-Spektrum ausgeschlossen werden.

Nach Integration aller Signale im ^1H -NMR konnten der endständigen Methylgruppe drei Protonen zugeordnet werden. Referenziert wurde dabei auf die Signale des Doppelbindungssystems. Im Falle einer weiteren endständigen Methylgruppe würde für diese jedoch ein Integral von sechs Protonen berechnet werden müssen. Weitere funktionelle Gruppen konnten mittels der NMR-Experimente ebenfalls nicht detektiert werden.

Damit das Verhältnis der Integrale von Protonen im Diensystem zu den Protonen der Methylgruppe von 4:3 erhalten bleiben kann, ist demnach eine Verdopplung des Protonensatzes nötig. Daraus schlussfolgert sich, dass mit Hilfe der NMR-Experimente

ein doppelter Satz von äquivalenten Protonen detektiert wurde. Demnach ergibt sich nach Spiegelung des Kohlenstoffgerüsts am offenen Ende die Struktur von Octacos-6,9,19,22-tetraen.

Diese Verbindung ist derzeit nicht literaturbekannt. Die fehlenden funktionellen Gruppen von Octacos-6,9,19,22-tetraen liefern eine mögliche Erklärung dafür, dass die Struktur mittels ESI-Ionisierung der verwendeten Massenspektrometer nicht ionisiert werden konnte. Auch reichen möglicherweise die Temperaturgradienten herkömmlicher GC-Verfahren nicht aus, um die Substanz im gasförmigen Zustand zu detektieren.

Zukünftig soll durch Ozonolyse eine Spaltung der Kohlenstoffkette induziert werden, und durch Detektion der Spaltelemente die Verbindung indirekt nachgewiesen werden.

4.5 Humane Geschmacksschwellenwerte der identifizierten Verbindungen

Damit der Beitrag der identifizierten Verbindung zum Geschmack bestimmt werden konnte, sollten zunächst deren humane Geschmacksschwellenwerte ermittelt werden. Falls bekannt, wurden dafür die Schwellenwerte der Literatur entnommen. Wenn keine solche Daten vorlagen, wurden die Schwellenwerte mittels des unter 6.2.6 beschriebenen Duo-Tests bestimmt.

Dazu wurden die isolierten Substanzen in 3 %iger ethanolischer Evian®-Lösung gelöst und je ein Aliquot schrittweise 1+1 verdünnt. Die Panelisten verkosteten im Anschluss die Verdünnungsreihe beginnend mit der niedrigsten Konzentration im Duo-Test gegen einen Blindwert. Aus der ersten sicher erkannten Konzentration der jeweiligen Panelisten wurde dann der Schwellenwert berechnet. Die Schwellenwerte der identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Tabelle 4-1: Geschmacksqualität und Geschmacksschwellenwerte der identifizierten Verbindungen.

Bezeichnung	Substanz	Geschmacksqualität	Schwellenwert [mmol/l]
I-11-16-1	(10E,12Z)-9-Hydroxyocta-deca-10,12-diensäure	bitter, kratziger Nachgeschmack ^{a)}	0,35 ^{a)}
	(10E,12E)-9-Hydroxyoctadeca-10,12-diensäure	ausstehend	ausstehend
	(9Z,11E)-13-Hydroxyoctadeca-9,11-diensäure	bitter, kratziger Nachgeschmack ^{a)}	0,79 ^{a)}
	(9E,11E)-13-Hydroxyoctadeca-9,11-diensäure	bitter, kratziger Nachgeschmack ^{a)}	0,97 ^{a)}
I-11-16-2	1-Linoleoylglycerol	bitter ^{b)}	0,07 ^{b)}
I-11-16-3	Linolensäure	bitter, kratziger Nachgeschmack ^{c)}	0,28 ^{c)}
I-11-16-4	2-Hydroxypalmitinsäure	bitter, adstringierend ^{d)}	0,22 ^{d)}
I-11-16-5	2-Hydroxyölsäure	bitter, adstringierend ^{d)}	0,06 ^{d)}
I-11-16-6	Linolsäure	bitter, kratziger Nachgeschmack ^{a)}	0,93 ^{a)}
I-11-17-1	Octacosä-6,9,19,22-tetraen	ausstehend	ausstehend

^{a)} Lainer, 2014^{b)} Degenhardt, 2012^{c)} Günther-Jordanland, 2017^{d)} Meister, 2018

4.6 Spektroskopische Daten

Die Fehlgeschmackstoffe wurden im Rahmen der Arbeit mittels massenspektrometrischer (vgl. 6.5) und kernresonanzspektroskopischer (vgl. 6.6) Verfahren identifiziert. Die erfassten Daten sind nachfolgend zusammengefasst.

4.6.1 I-11-16-1 – Isomere von 9-HODE und 13-HODE

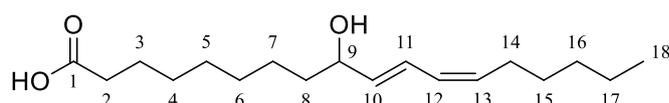


Abbildung 4-28: Struktur von (10E,12Z)-9-Hydroxyoctadeca-10,12-diensäure.

UHPLC-ToF-MS (ESI)⁻ berechnete Elementarzusammensetzung C₁₈H₃₂O₃: *m/z* [M-H]⁻

berechnet 295,4449; *m/z* detektiert 295,2283

MS/MS von *m/z* 295 (DP = (-28 V) – (-25 V)) *m/z* (%): 295 [M-H]⁻ (68), 277 [M-H₂O]⁻ (100), 171 (69)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ/ppm 0,81 [t, *J* = 6,8 Hz, 3H, H-C(18)], 1,23 [m, 14H, H-C(4), H-C(5), H-C(6), H-C(7), H-C(15), H-C(16), H-C(17)], 1,52 [m, 2H, H-C(8)], 1,56 [m, 2H, H-C(3)], 1,98 [m, 2H, H-C(14)], 2,27 [t, *J* = 7,4 Hz, 2H, H-C(2)], 3,44 [m, 1H, H-C(9)], 5,31 [m, 1H, H-C(10)], 5,62 [m, 1H, H-C(13)], 5,98 [m, 1H, H-C(12)], 6,06 [m, 1H, H-C(11)]

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ/ppm 14,07 [C(18)], 22,53 [C(17)], 24,69 [C(3)], 27,21 [C(14)], 28,88-29,38 [C(4), C(5), C(6), C(7), C(15)], 31,45 [C(16)], 33,69 [C(2)], 35,68 [C(8)], 82,36 [C(9)], 129,40 [C(12)], 131,39 [C(10)], 132,86 [C(11)], 135,33 [C(13)], 177,78 [C(1)]

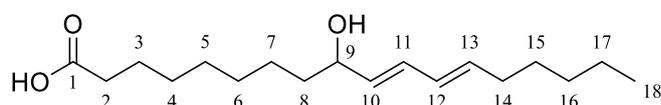


Abbildung 4-29: Struktur von (10E,12E)-9-Hydroxyoctadeca-10,12-diensäure.

UHPLC-ToF-MS (ESI)⁻ berechnete Elementarzusammensetzung C₁₈H₃₂O₃: *m/z* [M-H]⁻

berechnet 295,4449; *m/z* detektiert 295,2520

MS/MS von *m/z* 295 (DP = (-31 V) – (-28 V)) *m/z* (%): 295 [M-H]⁻ (29), 277 [M-H₂O]⁻ (100), 171 (66)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ/ppm 0,81 [t, *J* = 6,8 Hz, 3H, H-C(18)], 1,23 [m, 14H, H-C(4), H-C(5), H-C(6), H-C(7), H-C(15), H-C(16), H-C(17)], 1,52 [m, 2H, H-C(8)], 1,56 [m, 2H, H-

C(3)], 1,98 [m, 2H, H-C(14)], 2,27 [t, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-C(2)], 3,44 [m, 1H, H-C(9)], 5,31 [m, 1H, H-C(10)], 5,62 [m, 1H, H-C(13)], 5,98 [m, 1H, H-C(12)], 6,06 [m, 1H, H-C(11)]
 $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ/ppm 14,07 [C(18)], 22,53 [C(17)], 24,69 [C(3)], 27,21 [C(14)], 28,88-29,38 [C(4), C(5), C(6), C(7), C(15)], 31,45 [C(16)], 33,69 [C(2)], 35,68 [C(8)], 82,36 [C(9)], 129,40 [C(12)], 131,39 [C(10)], 132,86 [C(11)], 135,33 [C(13)], 177,78 [C(1)]

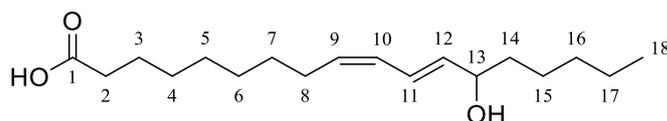


Abbildung 4-30: Struktur von (9Z,11E)-13-Hydroxyoctadeca-9,11-diensäure.

UHPLC-ToF-MS (ESI): berechnete Elementarzusammensetzung $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_3$: m/z [M-H]⁻ berechnet 295,4449; m/z detektiert 295,2280

MS/MS von m/z 295 (DP = (-28 V) – (-25 V)) m/z (%): 295 [M-H]⁻ (50), 277 [M-H₂O]⁻ (100), 195 (77)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ/ppm 0,81 [t, $J = 6,8$ Hz, 3H, H-C(18)], 1,23 [m, 12H, H-C(4), H-C(5), H-C(6), H-C(7), H-C(16), H-C(17)], 1,52 [m, 2H, H-C(14)], 1,56 [m, 2H, H-C(3)], 1,98 [m, 2H, H-C(7)], 2,27 [t, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-C(2)], 3,44 [m, 1H, H-C(13)], 5,31 [m, 1H, H-C(12)], 5,62 [m, 1H, H-C(9)], 5,98 [m, 1H, H-C(10)], 6,06 [m, 1H, H-C(11)]

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ/ppm 14,07 [C(18)], 22,53 [C(17)], 24,69 [C(3)], 27,21 [C(14)], 28,88-29,38 [C(4), C(5), C(6), C(7)], 31,45 [C(16)], 33,69 [C(2)], 35,68 [C(8)], 82,36 [C(13)], 129,40 [C(10)], 131,39 [C(12)], 132,86 [C(11)], 135,33 [C(9)], 177,78 [C(1)]

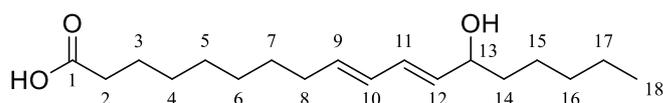


Abbildung 4-31: Struktur von (9E,11E)-13-Hydroxyoctadeca-9,11-diensäure.

UHPLC-ToF-MS (ESI): berechnete Elementarzusammensetzung $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_3$: m/z [M-H]⁻ berechnet 295,4449; m/z detektiert 295,2520

MS/MS von m/z 295 (DP = (-31 V) – (-28 V)) m/z (%): 295 [M-H]⁻ (29), 277 [M-H₂O]⁻ (100), 171 (66)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ/ppm 0,81 [t, $J = 6,8$ Hz, 3H, H-C(18)], 1,23 [m, 14H, H-C(4), H-C(5), H-C(6), H-C(7), H-C(15), H-C(16), H-C(17)], 1,52 [m, 2H, H-C(8)], 1,56 [m, 2H, H-C(3)], 1,98 [m, 2H, H-C(14)], 2,27 [t, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-C(2)], 3,44 [m, 1H, H-C(9)], 5,31 [m, 1H, H-C(10)], 5,62 [m, 1H, H-C(13)], 5,98 [m, 1H, H-C(12)], 6,06 [m, 1H, H-C(11)]

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ/ppm 14,07 [C(18)], 22,53 [C(17)], 24,69 [C(3)], 27,21 [C(14)], 28,88-29,38 [C(4), C(5), C(6), C(7), C(15)], 31,45 [C(16)], 33,69 [C(2)], 35,68 [C(8)], 82,36 [C(9)], 129,40 [C(12)], 131,39 [C(10)], 132,86 [C(11)], 135,33 [C(13)], 177,78 [C(1)]

4.6.2 I-11-16-2 – 1-Linoleoylglycerol

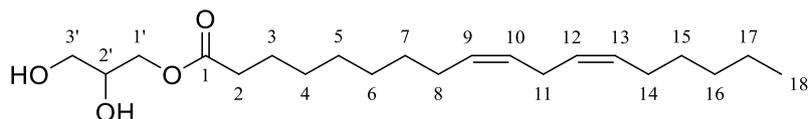


Abbildung 4-32: Struktur von 1-Linoleoylglycerol.

UHPLC-ToF-MS (ESI)⁺ berechnete Elementarzusammensetzung: C₂₁H₃₈O₄Na [M+Na]⁺,

m/z berechnet: 377,2668; *m/z* detektiert: 377,2707

MS/MS von *m/z* 355 (DP = 17 V – 26 V) *m/z* (%): 355 [M+H]⁺ (24), 337 [M-H₂O]⁺ (18)

MS/MS von *m/z* 377 (DP = 5 V – 11 V) *m/z* (%): 377 [M+Na]⁺ (100)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ/ppm 0,82 [t, *J* = 5,7 Hz, 3H, H-C(18)], 1,20 – 1,34 [m, 14H, H-C(4), H-C(5), H-C(6), H-C(7), H-C(15), H-C(16), H-C(17)], 1,56 [m, 2H, H-C(3)], 1,99 [m, 4H, H-C(8), H-C(14)], 2,28 [t, *J* = 7,4 Hz, 2H, H-C(2)], 2,70 [dt, *J* = 6,5 Hz/17,5 Hz, 2H, H-C(11)], 3,60 [m, 2H, H-C(3')], 3,86 [m, 2H, H-C(2')], 4,08 [dd, *J* = 4,5 Hz/11,4 Hz, 1H, H_α-C(2')], 4,14 [dd, *J* = 4,5 Hz/11,4 Hz, 1H, H_β-C(2')], 5,27 [m, 2H, H-C(10), H-C(12)], 5,30 [m, 2H, H-C(9), H-C(13)]

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ/ppm 14,07 [C(18)], 22,58 [C(17)], 24,90 [C(3)], 25,62 [C(11)], 27,21 [C(8), C(14)], 29,04 – 29,59 [C(4), C(5), C(6), C(7), C(15)], 31,53 [C(16)], 34,14 [C(2)], 63,34 [C(3')], 65,19 [C(1')], 70,28 [C(2')], 127,89/128,08 [C(10)/C(12)], 130,01/130,25 [C(9)/C(13)], 174,29 [C(1)]

4.6.3 I-11-16-3 – Linolensäure

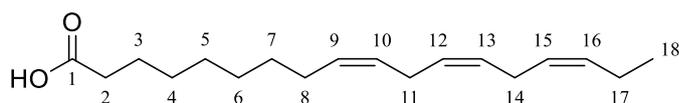


Abbildung 4-33: Struktur von Linolensäure.

UHPLC-ToF-MS (ESI)⁻ berechnete Elementarzusammensetzung C₁₈H₃₀O₂: *m/z* [M-H]⁻

berechnet 277,4455; m/z detektiert 277,2154

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ/ppm 0,91 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H, H-C(18)), 1,25 [m, 8H, H-C(4), H-C(5), H-C(6), H-C(7)], 1,56 [m, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-C(3)], 1,98 [dt, 2H, $J = 7,0/15,1$ Hz, H-C(17)], 2,28 [t, $J = 7,5$ Hz, 2H, H-C(2)], 2,74 [t, $J = 6,3$ Hz, 4H, H-C(11), H-C(14)], 5,30 [m, 6H, H-C(9), H-C(10), H-C(12), H-C(13), H-C(15), H-C(16)];

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm 14,21 [C(18)], 20,55 [C(17)], 24,57 [C(3)], 25,62 [C(11), C(14)], 27,20 [C(8)], 29,08-29,73 [C(4), C(5), C(6), C(7)], 127,11 [C(15)], 33,76 [C(2)], 127,75 [C(13)], 128,24/128,29 [C(12), C(10)], 130,24 [C(9)], 131,96 [C(16)], 178,44 [C(1)]

4.6.4 I-11-16-4 – 2-Hydroxypalmitinsäure

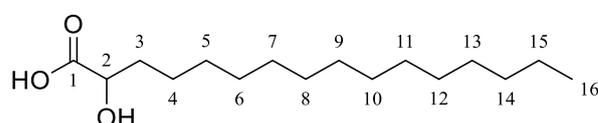


Abbildung 4-34: Struktur von 2-Hydroxypalmitinsäure.

UHPLC-ToF-MS (ESI) $^-$ berechnete Elementarzusammensetzung $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_3$: m/z [M-H] $^-$

berechnet 271,4235; m/z detektiert 271,2266

MS/MS von m/z 271 (DP = (-43) V – (-28) V) m/z (%): 271 [M-H] $^-$ (24), 253 [M-H $_2\text{O}$] $^-$ (3), 225 [M-CO $_2$ -H $_2$] $^-$ (100)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ/ppm 0,81 [t, $J = 6,8$ Hz, 3H, H-C(16)], 1,20 [m, 22H, H-C(5), H-C(6), H-C(7), H-C(8), H-C(9), H-C(10), H-C(11), H-C(12), H-C(13), H-C(14), H-C(15)], 1,57 [tt, $J = 7,4$ Hz, 2H, H-C(4)], 1,64 [m, 2H, H-C(3)], 4,19 [m, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-C(2)]

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ/ppm 14,28 [C(16)], 22,69 [C(15)], 24,77 [C(4)], 29,29-29,69 [C(5), C(6), C(7), C(8), C(9), C(10), C(11), C(12), C(13)], 31,93 [C(14)], 34,24 [C(3)], 70,23 [C(2)], 177,96 [C(1)]

4.6.5 I-11-16-5 – 2-Hydroxyölsäure

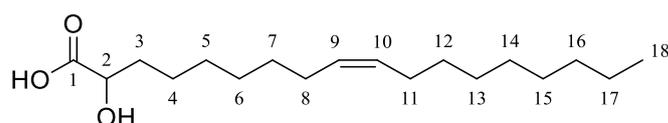


Abbildung 4-35: Struktur von 2-Hydroxyölsäure.

UHPLC-TOF-MS (ESI) $^-$ berechnete Elementarzusammensetzung $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_3$ [M-H] $^-$, m/z

berechnet: 297,4608; m/z detektiert: 297,2434

MS/MS von m/z 297 (DP = (-42 V) – (-27 V)) m/z (%): 297 [M-H]⁻ (53), 279 [M-H₂O]⁻ (6), 251 [M-CO₂-H₂]⁻ (100)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm 0,81 [t, J = 7,15 Hz, 3H, H-C(18)], 1,22 [m, 18H, H-C(5), H-C(6), H-C(7), H-C(12), H-C(13), H-C(14), H-C(15), H-C(16), H-C(17)], 1,56 [m, 2H, H-C(4)], 1,96 [m, 4H, H-C(8), H-C(11)], 2,28 [t, J = 7,42 Hz, 2H, H-C(3)], 4,18 [m, 1H, H-C(2)], 5,25/5,31 [m, 2H, H-C(9), H-C(10)]

¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm 14,11 [C(18)], 22,68 [C(17)], 24,77 [C(4)], 27,23 [C(8), C(11)], 29,03-29,77 [C(5), C(6), C(7), C(12), C(13), C(14), C(15)], 31,91 [C(16)], 34,28 [C(3)], 70,22 [C(2)], 129,69/130,04 [C(9), C(10)], 178,12 [C(1)]

4.6.6 I-11-16-6 – Linolsäure

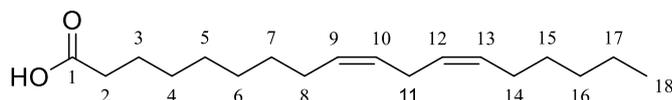


Abbildung 4-36: Struktur von Linolsäure.

UHPLC-ToF-MS (ESI) berechnete Elementarzusammensetzung C₁₈H₃₂O₂: m/z [M-H]⁻

berechnet 279,4455; m/z detektiert 279,2315

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ /ppm 0,91 [t, 3H, J = 6,8 Hz, H-C(18)], 1,33-1,36 [m, 12H, H-C(4), H-C(5), H-C(6), H-C(7), H-C(15), H-C(16), H-C(17)], 1,65 [m, 2H, J = 7,3 Hz, H-C(3)], 2,07 [m, 4H, J = 7,0 Hz, H-C(8), H-C(14)], 2,36 [t, 2H, J = 7,5 Hz, H-C(2)], 2,79 [dd, 2H, J = 6,8 Hz, H-C(11)] 5,36 [m, 2H, H-C(10), H-C(12)], 5,39 [m, 2H, H-C(9), H-C(13)]

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ /ppm 14,06 [C(18)], 22,57 [C(17)], 24,71 [C(3)], 25,63 [C(11)], 27,19 [C(8), C(14)], 29,04-29,68 [C(4), C(5), C(6), C(7), C(15)], 31,53 [C(16)], 33,88 [C(2)], 127,90/ 128,05 [C(10), C(12)], 130,03/ 130,21 [C(9), C(13)], 178,55 [C(1)]

4.6.7 I-11-17-1 – Octacososa-6,9,19,22-tetraen

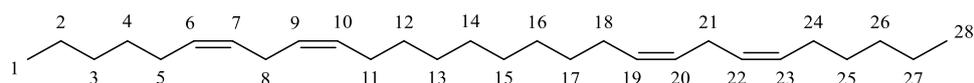


Abbildung 4-37: Struktur von Octacososa-6,9,19,22-tetraen.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ /ppm 0,93 [t, 6H, J = 6,5 Hz, H-C(1), H-C(28)], 1,28-1,34 [m, 24H, H-C(2), H-C(3), H-C(4), H-C(12), H-C(13), H-C(14), H-C(15), H-C(16), H-C(17), H-

C(25), H-C(26), H-C(27)], 2,08 [m, 8H, H-C(5), H-C(11), H-C(18) H-C(24)], 2,80 [t, 4H, $J = 6,4$ Hz, H-C(8), H-C(21)] 5,34 [m, 4H, H-C(7), H-C(9), H-C(20), H-C(22)], 5,39 [m, 4H, H-C(6), H-C(10), H-C(19), H-C(23)]

$^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ/ppm 13,93 [C(1), C(28)], 22,57 [C(2), C(27)], 25,61 [C(8) C(21)], 27,16/27,22 [C(6), C(11), C(18), C(23)], 29,04-29,64 [C(4), C(12), C(13), C(14), C(15), C(16), C(17), C(25)], 31,23 [C(3), C(26)], 127,88/128,01 [C(7), C(9), C(20), C(22)], 130,03/130,20 [C(6), C(10), C(19), C(23)]

4.7 Screening auf literaturbekannte Fehlgeschmacksstoffe in Erbsenproteinisolaten und deren Beitrag zum Fehlgeschmack

Neben der aktivitätsorientierten Fraktionierung sollte das Erbsenproteinisolat auch auf literaturbekannte Bitterstoffe wie Saponine (*Price et al., 1985* und *Heng et al., 2006*) und Adstringenzen wie Flavonoide (*Jin et al., 2012*) untersucht und deren Einfluss auf den Fehlgeschmack ermittelt werden.

4.7.1 Soyasaponin I in Erbsenproteinsiolaten

Die per MPLC (vgl. 4.4.4 und 6.4.1) gewonnenen Fraktionen wurden mittels einer UHPLC-ToF-MS-Methode (siehe 6.5.1) zunächst flüssigkeitschromatographisch aufgetrennt und nachfolgend massenspektrometrisch analysiert. Dadurch sollten die Fraktionen auf Masse-Ladungsverhältnisse (m/z) und Massenspektren literaturbekannter Stoffe hin untersucht werden.

Nach Auswertung der Spektrensätze aller Fraktionen konnten in Fraktion I-10 Hinweise auf die Existenz eines bekannten Bitterstoffs gefunden werden. Der detektierte Peak im entsprechenden Chromatogramm (siehe Abbildung 4-1) bei einer Retentionszeit von $t_R=1,5$ min mit den zugehörigen Basisionenpeaks von $m/z = 943,5271$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) im positiven sowie $m/z = 941,5110$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$) im negativen Messmodus sind möglicherweise auf Soyasaponin I zurückzuführen.

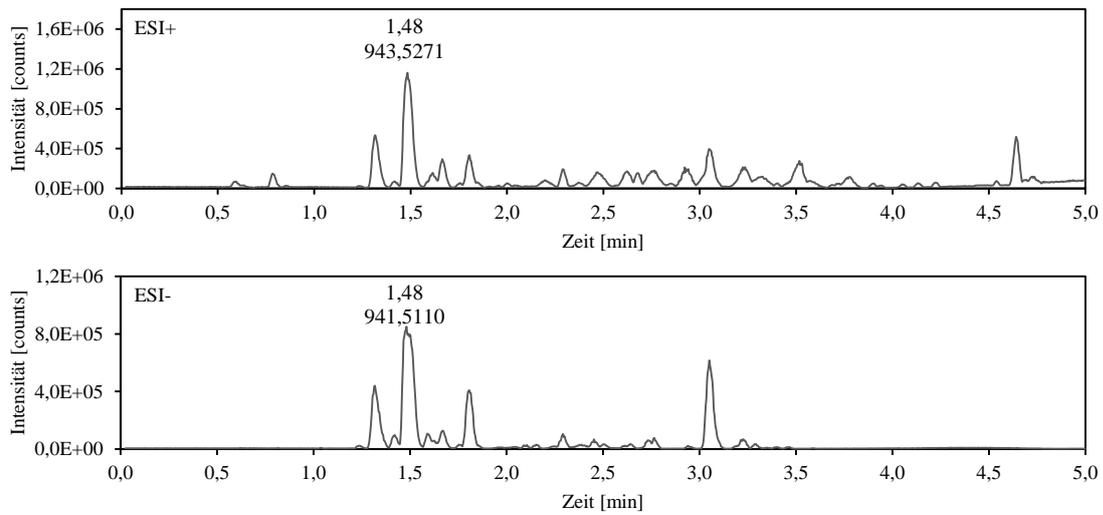


Abbildung 4-38: UHPLC-ToF-MS Screening von Fraktion I-10 im positiven und negativen Ionisierungsmodus.

Die zugehörigen Massenspektren und Fragmentierungsmuster (siehe Abbildung 4-39) stimmen mit den von *Fang et al. (2004)*, *Tsunoda et al. (2008)* sowie *Reim und Rohn (2015)* beschriebenen überein. Des Weiteren wurde mithilfe der Auswertesoftware MassLynx eine Elementarzusammensetzung der Basisionenpeaks von $C_{48}H_{78}O_{18}$ berechnet. Diese entspricht dem Soyasaponin I.

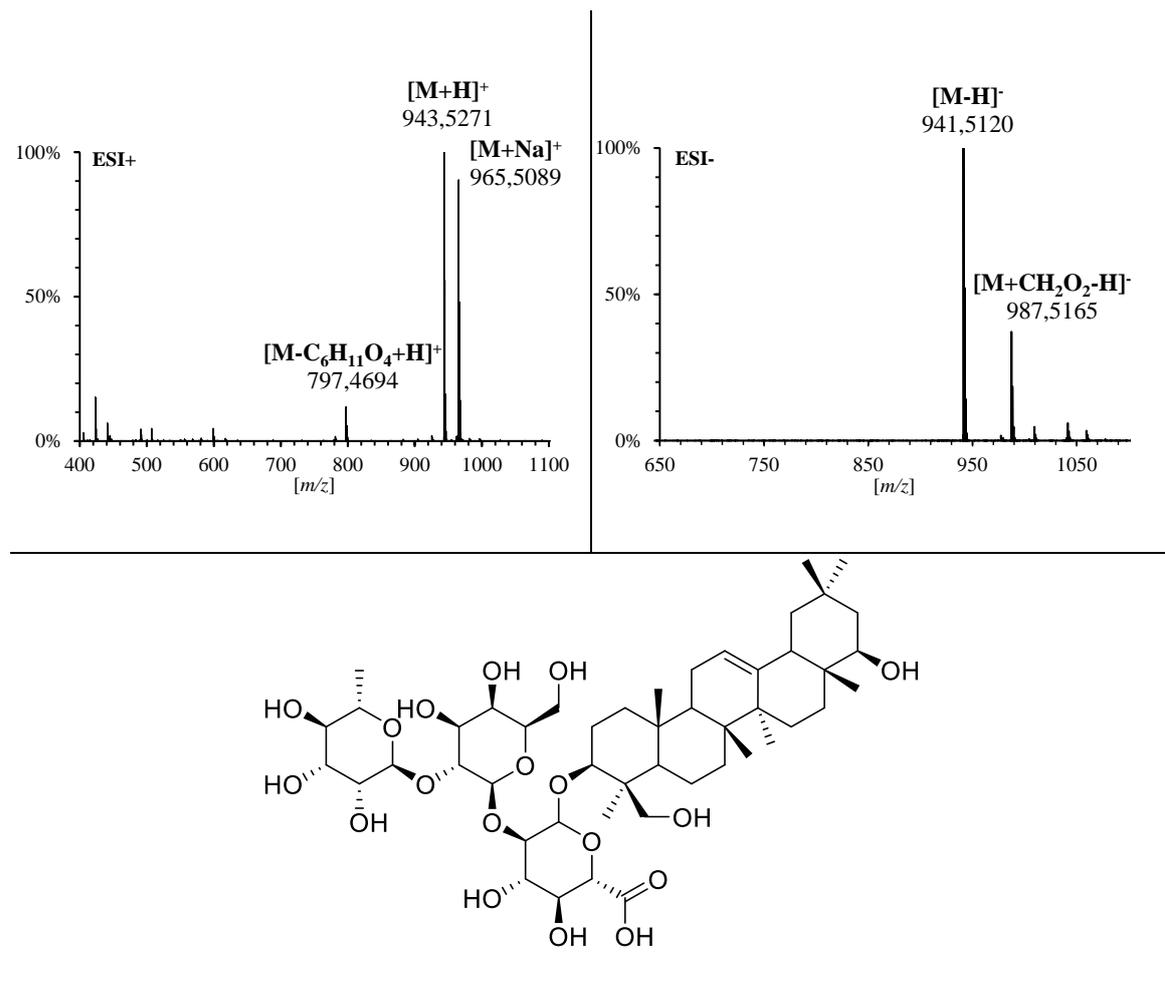


Abbildung 4-39: Massenspektren (oben) und Strukturformel (unten) von Soyasaponin I.

Um zu verifizieren, dass es sich bei der vermuteten Substanz um Soyasaponin I handelt wurde ebenfalls ein kommerzieller Soyasaponinstandard mit der UHPLC-ToF-MS-Methode im negativen Ionisierungsmodus gemessen. Anschließend wurden die Retentionszeiten und Massenspektren mit denen der Fraktion I-10 verglichen. Die erhaltenen Chromatogramme sind nachfolgend dargestellt (Abbildung 4-40).

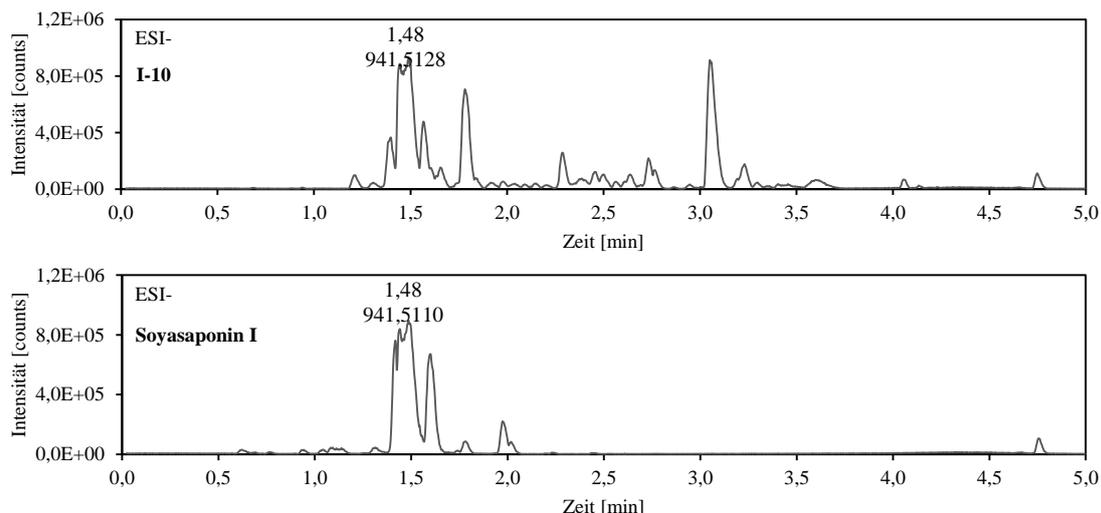


Abbildung 4-40: UHPLC-ToF-MS-Chromatogramme der Fraktion I-10 (oben) und eines Soyasaponinstandards (unten) im negativen Ionisierungsmodus.

Sowohl im Chromatogramm der Fraktion I-10 als auch in dem des Soyasaponins ist ein Peak bei einer Retentionszeit von $t_R=1,5$ min mit dem zugehörigen Masse-Ladungsverhältnis des Basispeaks bei $m/z=941,5110$ detektierbar. Die berechnete Elementarzusammensetzung von $C_{48}H_{78}O_{18}$ und das Fragmentierungsmuster waren ebenfalls identisch (siehe Abbildung 4-40). Es ist somit davon auszugehen, dass sich Soyasaponin I in Fraktion I-10 des Erbsenproteinisolats befindet.

Die sensorische Evaluation von I-10 (vgl. 4.4.4, Abbildung 4-6) ergab einen niedrigen GV-Faktor von 4 im Vergleich zu den anderen Fraktionen. Es ist daher davon auszugehen, dass der Einfluss des Soyasaponin I auf den Fehlgeschmack als gering einzustufen ist.

4.7.2 Lipidoxidationsprodukte in Erbsenproteinisolaten

Die mittels präparativer HPLC generierten Subfraktionen (siehe 4.4.5 und 6.4.2) wurden ebenfalls auf bekannte Masse-Ladungsverhältnisse und Fragmentierungsmuster hin untersucht. Dafür wurden die Proben mittels einer UHPLC-ToF-MS-Methode (siehe 6.5.1) flüssigkeitschromatographisch aufgetrennt und am Flugzeitmassenspektrometer detektiert. Die so erhaltenen Massenspektren wurden anschließend auf literaturbekannte Verbindungen hin untersucht. In den Fraktionen I-11-13 bis I-11-15 konnten dadurch Hinweise auf Lipidoxidationsprodukte gewonnen werden.

In Abbildung 4-41 ist das Chromatogramm der vereinigten Fraktionen dargestellt. Hervorgehoben sind die Peaks bei $t_R = 1,01$ min ($m/z = 329,2317$), $t_R = 1,93$ min ($m/z = 295,2267$) und $t_R = 2,08$ min ($m/z = 293,2113$).

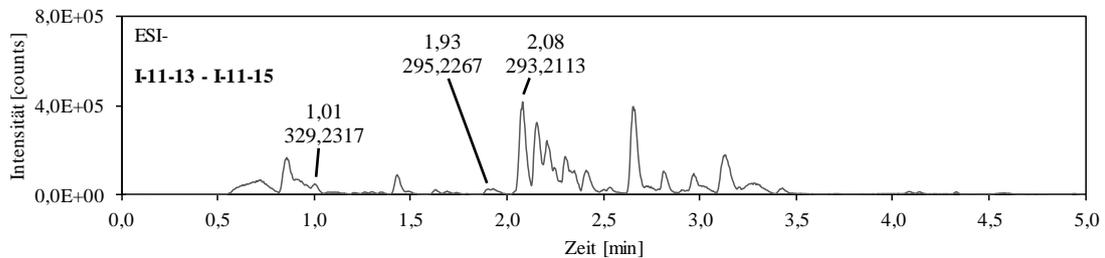


Abbildung 4-41: UHPLC-ToF-MS-Chromatogramm der vereinigten Subfraktion I-11-13 bis I-11-15 im negativen Ionisierungsmodus.

Die berechneten Elementarzusammensetzungen, sowie der Vergleich mit Referenzspektren (*Lainer, 2014*) geben Aufschluss über Strukturmerkmale der Substanzen. Für den Peak mit der Retentionszeit von $t_R = 1,01$ min und dem Masse-Ladungsverhältnis von $m/z = 329,2317$ konnte die Elementarzusammensetzung $C_{18}H_{34}O_5$ berechnet werden. Diese entspricht Trihydroxyoctadecensäure. Nach Vergleich mit einer Multistandardlösung (*Lainer, 2014*) ist davon auszugehen, dass es sich bei der Substanz um das Isomer 9,10,13-Trihydroxyocatadec-10-ensäure (9,10,13-THOA) handelt. Sowohl das Massenspektrum als auch die Retentionszeit stimmen mit dem Standard überein (siehe Abbildung 4-40).

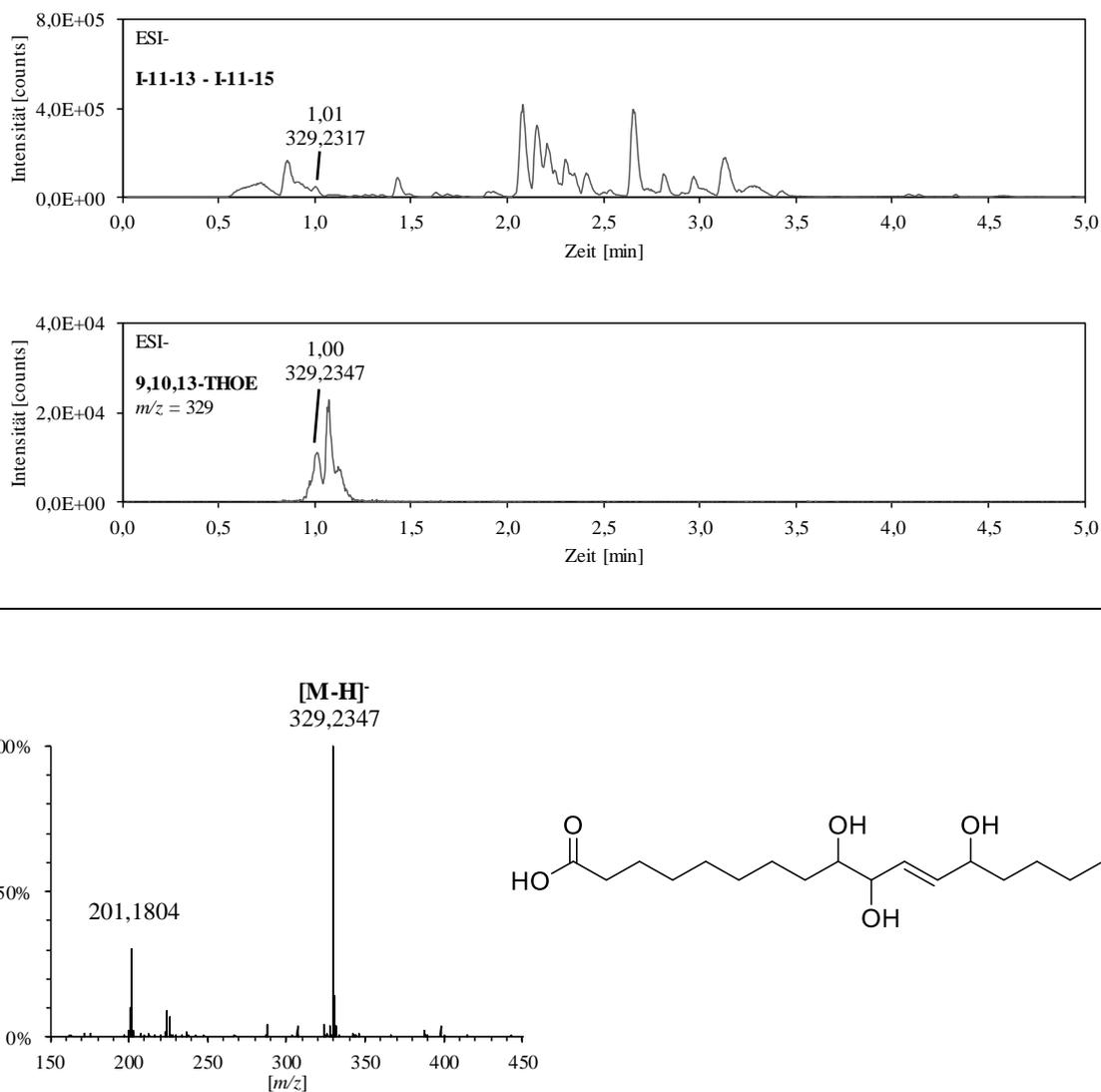


Abbildung 4-42: UHPLC-ToF-MS-Chromatogramme der vereinigten Subfraktion I-11-13 bis I-11-15 im Vergleich zur Massenspur $m/z = 329$ der Multistandardlösung (oben) sowie Massenspektrum (unten links) und Strukturformel (unten rechts) von 9,10,13-THOE.

Für den Peak mit der Retentionszeit von $t_R = 1,93$ min ($m/z = 295,2267$) wurde eine Elementarzusammensetzung von $C_{18}H_{32}O_3$ berechnet. Diese entspricht Hydroxyoctadecadiensäuren. Charakteristische Produkte aus der Lipidoxidation von Linolsäure sind dabei 9-Hydroxyocatadeca-10,12-diensäure (9-HODE) und 13-Hydroxyoctadeca-9,11-diensäure (13-HODE) (Belitz *et al.*, 2007). Eine exakte Unterscheidung dieser oder weiterer Isomere war mittels der *Screening*-Methode nicht möglich. Jedoch konnten diverse Isomere der Hydroxyocatdecadiensäuren in Fraktion I-11-16 identifiziert werden (vgl. 4.4.6 und 4.6). Es ist daher möglich, dass die identifizierten Isomere aufgrund von unvollständiger chromatographischer Trennung auch in dieser Fraktion präsent sind.

Nachfolgend sind das erhaltene Massenspektrum und die Strukturformeln von 9-HODE und 13-HODE dargestellt (siehe Abbildung 4-43).

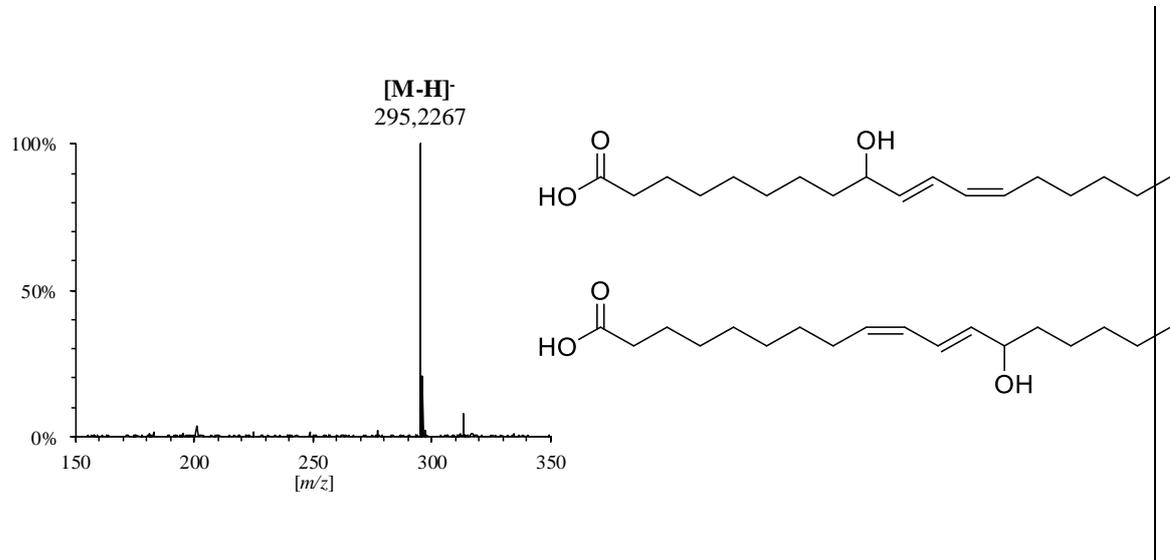


Abbildung 4-43: Massenspektren (links) und Strukturformeln von 9-HODE (rechts oben) und 13-HODE (rechts unten).

Die Elementarzusammensetzung für den Peak mit der Retentionszeit von $t_R = 2,08$ min und dem Masse-Ladungsverhältnis von $m/z = 293,2113$ wurde mit $C_{18}H_{30}O_3$ berechnet. Diese kann Oxooctadecadiensäuren zugeordnet werden. Dabei sind 9-Oxooctadeca-10,12-diensäure und 13-Oxooctadeca-9,11-diensäure ebenfalls Teil des Produktspektrums der Lipidoxidation von Linolsäure (Belitz *et al.*, 2007). Eine präzise Aussage darüber welche Isomere im *Screening* detektiert wurden, ist nicht möglich. Abbildung 4-44 sind das detektierte Massenspektrum und die Strukturformeln der Isomere 9-Oxooctadeca-10,12-diensäure und 13-Oxooctadeca-9,11-diensäure zu entnehmen.



Abbildung 4-44: Massenspektren (links) und Strukturformeln von 9-Oxooctadeca-10,12-diensäure (rechts oben) und 13-Oxooctadeca-9,11-diensäure (rechts unten).

Der Einfluss der im *Screening* detektierten Lipidoxidationsprodukte auf den Geschmack kann bislang nur abgeschätzt werden. Es wurden jedoch in Fraktion I-11 hohe GV-Faktoren für die Subfraktionen ermittelt, in denen Lipide und Lipidoxidationsprodukte identifiziert oder *gescreent* wurden (vgl. 4.4.5). Dies deutet darauf hin, dass Lipidoxidationsprodukte für den Fehlgeschmack eine tragende Rolle spielen.

5 Sojaproteinisolate (*Glycine max* L. MERR.) – Ergebnisse und Diskussion

Nebst den bereits diskutierten Erbsenproteinisolaten (siehe 0) gelten auch Sojaproteinisolate als bitter und adstringierend. Nachfolgend werden humansensorische Test zur Charakterisierung des *Off-Flavors* und analytische Verfahren zur Klärung dessen Ursache erläutert.

5.1 Geschmacksprofilanalyse eines Referenzsojaproteinisolats

Für vergleichende Profilanalysen und zur Gewinnung eines Geschmackseindrucks wurde gemäß 6.2.2 eine Geschmacksprofilanalyse der Probe Supro XT 219DIP 2013 als Referenz durchgeführt. Infolgedessen wurden 6 g des Isolats in 100 ml Evian®-Wasser (pH=5,5) suspendiert. Das Gemisch wurde über die komplette Durchführungsdauer des Versuchs mittels eines Magnetrührwerks homogenisiert. Die Panelisten wurden nachfolgend gebeten die Intensitäten der Probe in den Attributen süß, sauer, umami, salzig, bitter, adstringierend und brennend auf einer linienlosen Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) zu bewerten. Das Geschmacksprofil der Probe Supro XT 219DIP 2013 (siehe Abbildung 5-1) konnte nun für weitere vergleichende Bewertungen (siehe 5.2 und 5.3) herangezogen werden.

Attribut	MW±CV
süß	1,1±0,2
sauer	0,4±0,3
umami	0,4±0,2
salzig	0,3±0,1
bitter	2,2±0,2
adstringierend	1,4±0,3
brennend	0,4±0,2

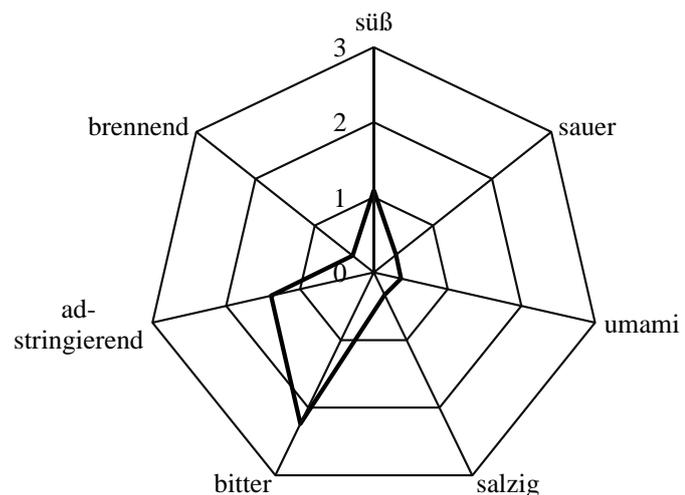


Abbildung 5-1: Geschmacksprofil des Sojaproteinisolats Supro XT 219DIP 2013 (MW±CV; $\alpha=0,05$; n=38).

Die Referenzprobe weist hohe Intensitäten für die Attribute bitter ($2,2 \pm 0,2$) und adstringierend ($1,4 \pm 0,3$) auf. Das Panel erkannte demnach den Fehlgeschmack von Sojaproteinisolaten. Weiterhin zeigte sich eine mittlere Intensität für die Geschmacksqualität süß ($1,1 \pm 0,2$). Alle anderen Attribute wurden vom Panel nur wenig intensiv wahrgenommen.

5.2 Einfluss des pH-Werts auf das Geschmacksprofil von Sojaproteinisolaten

Zur Entwicklung weiterer analytischer Methoden und zur Charakterisierung der pH-Abhängigkeit der Fehlgeschmacksattribute wurde das Referenzsojaproteinisolat (vgl. 5.1) einer vergleichenden Geschmacksprofilanalyse unterzogen (vgl. 6.2.3). Getestet wurden dabei pH-Werte zwischen 3,5 und 7,5. Diese sollten mögliche Lebensmittelmatrizes repräsentieren. Als Referenzlösung diente dabei, das Proteinisolat aus 5.1, welches auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt wurde. Das Ergebnis des Tests ist in Abbildung 5-2 dargestellt.

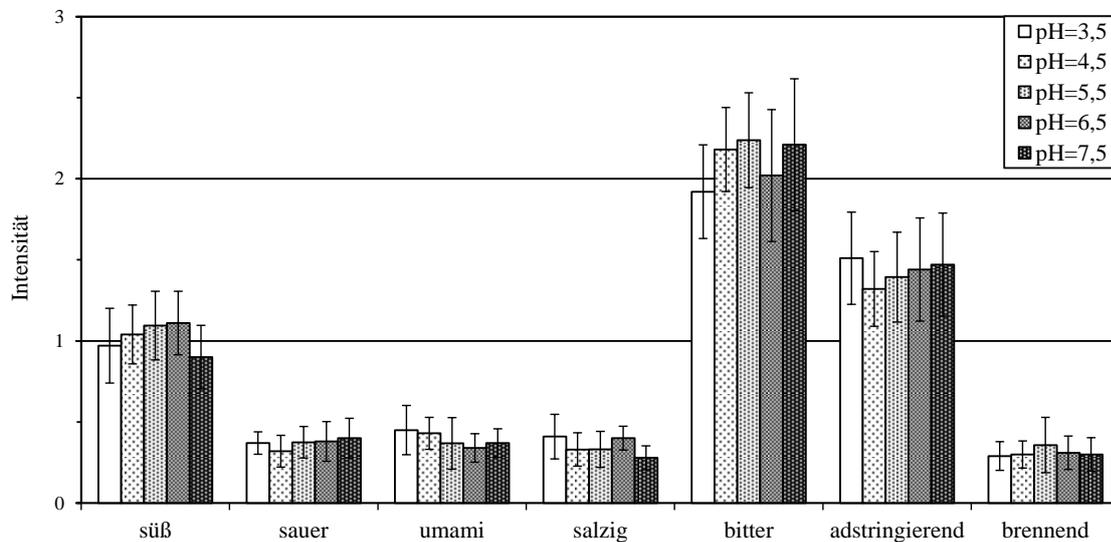


Abbildung 5-2: Einfluss des pH-Werts auf das Geschmacksprofil des Sojaproteinisolats Supro XT 219 DIP (MW \pm CV; $\alpha=0,05$; n=16).

Wie ebenfalls bei dem Referenzersbensenproteinisolat (4.2) zu beobachten war, hat der pH-Wert einen vernachlässigbaren Einfluss auf das Geschmacksprofil des Sojaproteinisolats Supro XT 219DIP 2013 (siehe 4.2). Alle folgenden analytischen und

sensorischen Tests wurden daher weiterhin mit Lösungen durchgeführt, deren pH-Wert auf 5,5 eingestellt ist.

5.3 Geschmacksprofilanalysen handelsüblicher Sojaproteinisolat

Um herauszufinden, welches handelsübliche Sojaproteinisolat sich aufgrund seines ausgeprägten Fehlgeschmacks am besten für weitere analytische Tests eignete, wurde eine weitere vergleichende Geschmacksprofilanalyse (vgl. 6.2.3) durchgeführt. Dafür wurden vier weitere handelsübliche Sojaproteinisolat gegen die in 5.1 bestimmte Referenz sensorisch beurteilt. Abbildung 5-3 stellt die Geschmacksprofile der einzelnen Proteinisolat gegenüber.

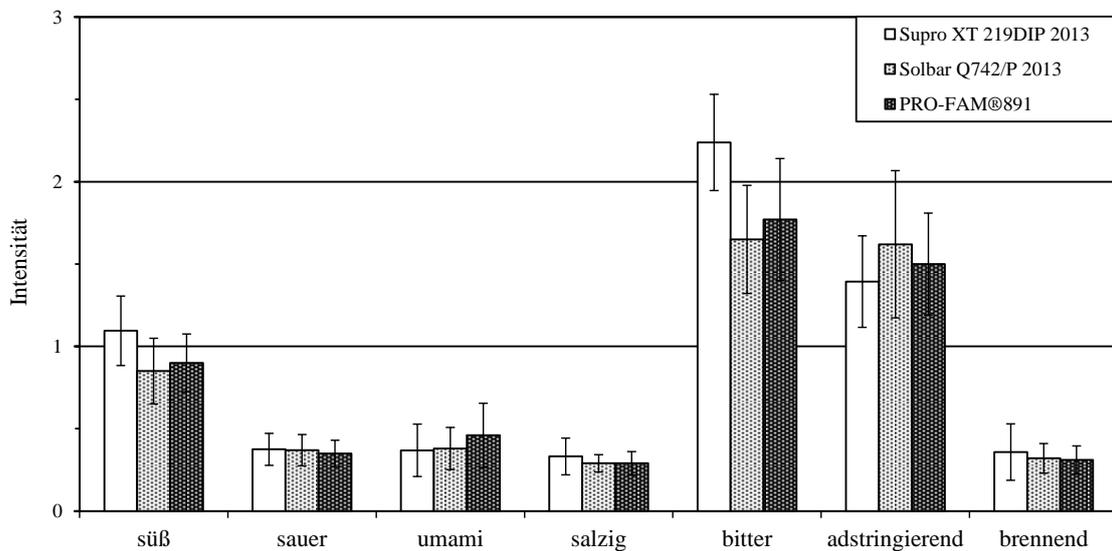


Abbildung 5-3: Vergleich der Geschmacksprofile handelsüblicher Sojaproteinisolat (MW±CV; $\alpha=0,05$; n=17).

Ähnlich der Referenz zeigten die Proteinisolat Solbar X742/P 2013 und PRO-FAM®891 hohe Intensitäten in den Geschmacksattributen bitter (1,7 und 1,8) und adstringierend (1,6 und 1,5) sowie eine mittlere Süßintensität (je 0,9). Somit wiesen alle Proteinisolat ähnliche geschmackliche Eigenschaften auf. Für nachfolgende sensorische und analytische Methoden wurde daher weiterhin das Sojaproteinisolat Supro XT 219DIP 2013 verwendet.

5.4 Aktivitätsorientierte Fraktionierung und Identifizierungsexperimente

Um herauszufinden, welche Substanzen für den Fehlgeschmack von Sojaproteinisolaten verantwortlich sind, wurden diese Fraktionierungsexperimenten unterzogen. Für die nachfolgenden Versuche wurde das Sojaproteinisolat Supro XT 219DIP verwendet.

5.4.1 Sequentielle Lösungsmittlextraktion

Analog der Erbsenproteinisolate (siehe 4.4) wurde davon ausgegangen, dass Fehlgeschmackstoffe am Protein durch molekulare Wechselwirkungen anhaften. Zum Abtrennen dieser wurde eine sequentielle Lösungsmittlextraktion (vgl. 6.3.1) durchgeführt. Dazu wurde das Extraktionsverfahren der Erbsenproteinisolate (siehe 4.4.1) aufgrund des höheren Gelbildungsvermögens leicht modifiziert.

Demnach wurden 340 g des Isolats je drei Mal mit Lösungsmitteln (je 1400 ml) sinkender Polarität unter ständigem Rühren in einem Becherglas (5000 ml) extrahiert und im Anschluss filtriert. Als Extraktionsmittel wurden MeOH/Wasser (I), MeOH (II), MeOH/Aceton (III), Ethylacetat (IV) und Pentan (V) gewählt (siehe Abbildung 5-4). Das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotationsverdampfer entfernt und die Extrakte gefriergetrocknet. Nach Zugabe von Reinstwasser zum Extraktionsrückstand wird dieser ebenfalls zweifach lyophilisiert. Die Ausbeuten sind in Anhang A.1 aufgeführt.

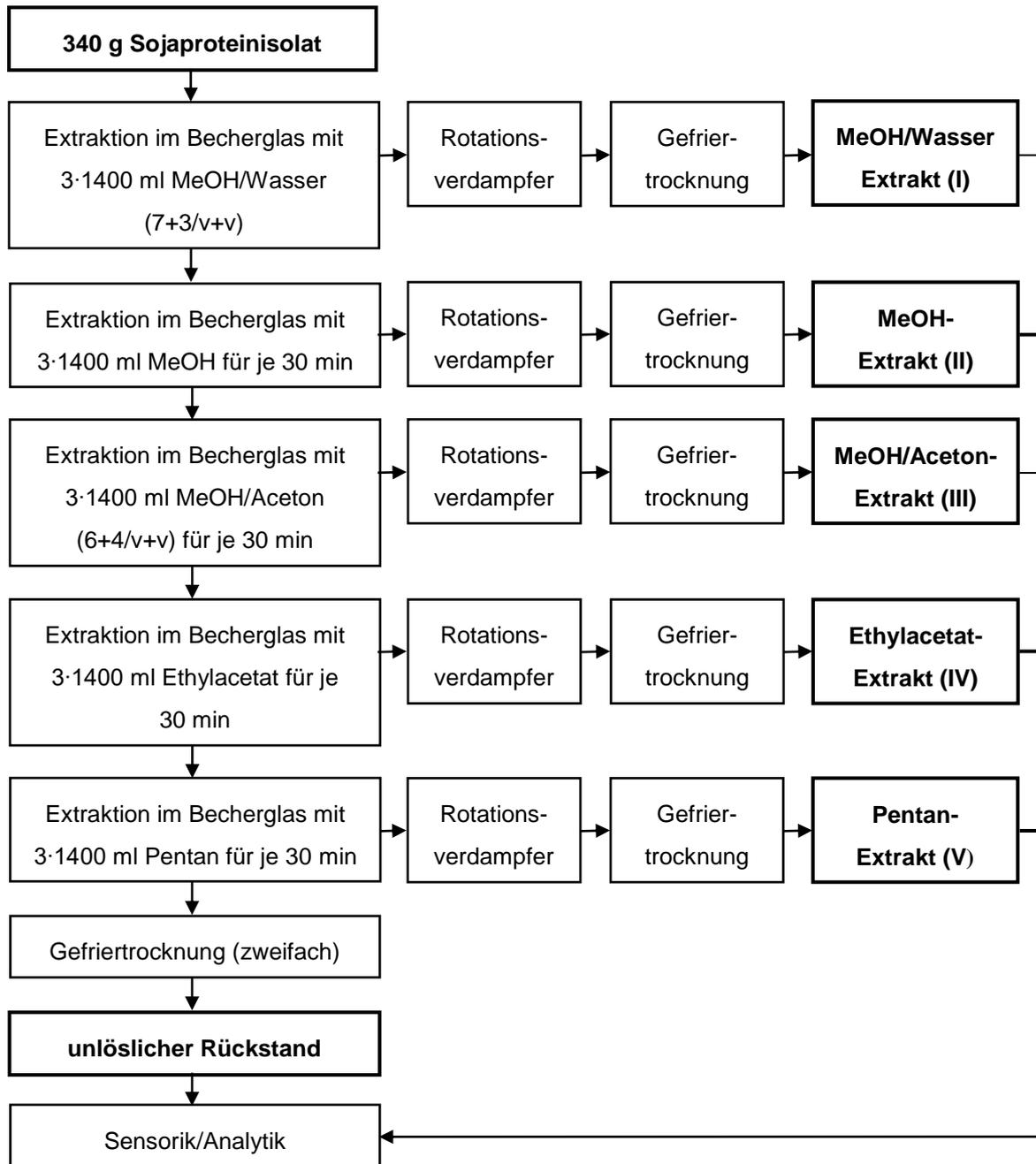


Abbildung 5-4: Verlaufsschema der sequentiellen Lösungsmittlextraktion des Sojaproteinisolats.

Die Extrakte und der unlösliche Rückstand wurden zum aktuellen Stand noch nicht sensorisch evaluiert.

5.5 Identifizierung literaturbekannter Fehlgeschmacksstoffe in Sojaproteinisolaten und deren Beitrag zum Fehlgeschmack

Das Sojaproteinisolat sollte nicht nur aktivitätsorientiert analysiert, sondern auch in Hinblick auf bekannte Bitterstoffe und Adstringenzen untersucht werden.

5.5.1 Soyasaponin I und Flavonoide in Sojaproteinsiolaten

Für einen ersten Überblick wurden die nach 5.4.1 gewonnenen Extrakte I bis IV mittels einer UHPLC-ToF-MS-Methode (siehe 6.5.1) auf bekannte Masse-Ladungsverhältnisse, Fragmentierungsmuster und Elementarzusammensetzungen untersucht. Diskutiert wurden in der Literatur bislang beispielsweise Saponine (*Kitagawa et al., 1988*), Isoflavone (*Matsuura et al., 1989; Kudou et al., 1991; Okubo et al., 1992* sowie *Matsuura und Obata, 1993*) und phenolische Säuren (*Arai et al., 1966*).

In Anlehnung an *Fang et al. (2004)* wurde parallel zum Massendetektor mit einem UV-Detektor die Absorption bei 265 nm gemessen. Dadurch sollten weitere Hinweise auf die Existenz von Flavonoiden im Extrakt gewonnen werden.

Durch das Screening konnten im Extrakt I Rückschlüsse auf die Anwesenheit der Flavonoide Genistin, Genistein und Daidzein sowie Soyasaponin I gezogen werden. Die Chromatogramme sind nachfolgend in Abbildung 5-5 zu sehen.

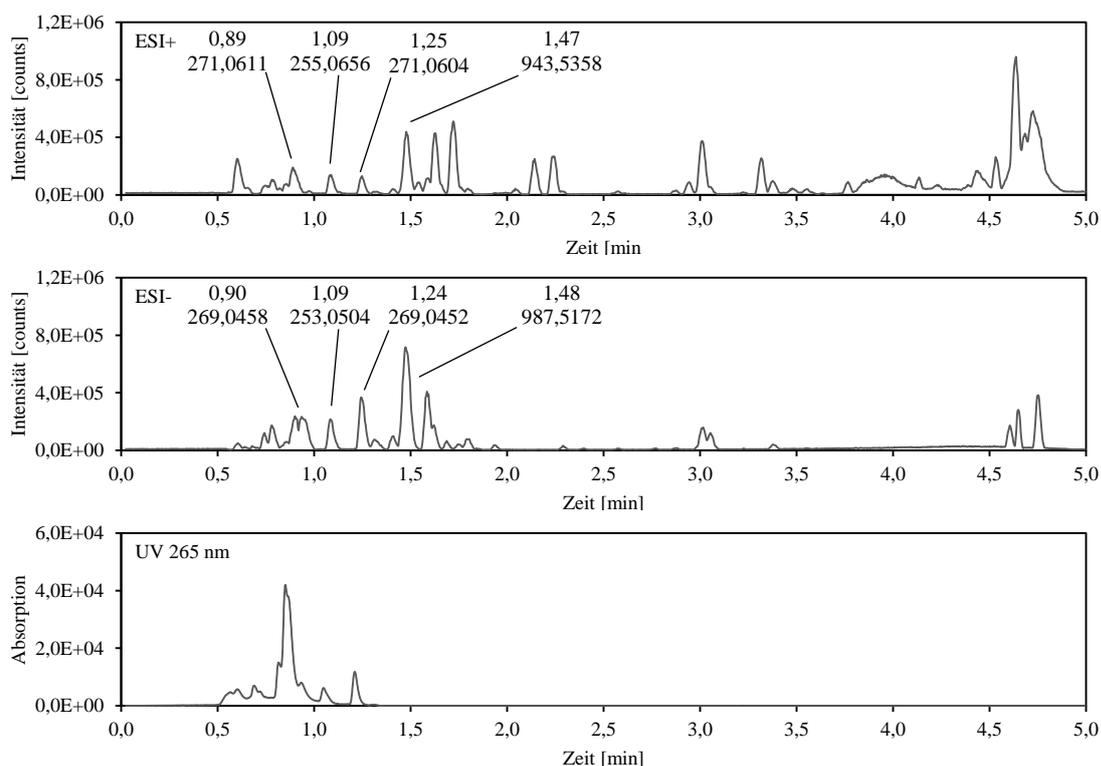


Abbildung 5-5: UHPLC-ToF-MS/UV Screening von Extrakt I im positiven und negativen Ionisierungsmodus und bei einer UV-Absorption von 265 nm.

Nach Auswertung der Massenspektren und Berechnung der Elementarzusammensetzungen mit der Software MassLynx ließen sich den Peaks Substanzen zuordnen. Die Fragmentierungsmuster sind in Abbildung 5-6 exemplarisch im negativen Messmodus dargestellt. Demnach wurden im Extrakt die Flavonoide Genistin ($C_{21}H_{20}O_{10}$, $t_R=0,9$ min), Daidzein ($C_{15}H_{10}O_4$, $t_R=1,1$ min) und Genistein ($C_{15}H_{10}O_5$, $t_R=1,3$) vermutet. Die Retentionszeiten in Massen- und UV-Chromatogramm sind identisch. Des Weiteren stimmen Fragmentierungsmuster, Elementarzusammensetzung und Retentionszeit des Soyasaponin I mit denen aus den Identifizierungsexperimenten des Erbsenproteinisolats (vgl. 4.7.1) überein.

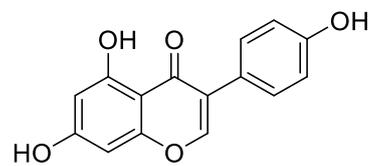
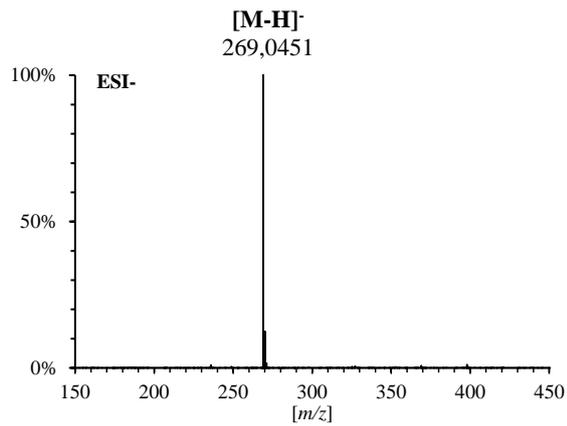
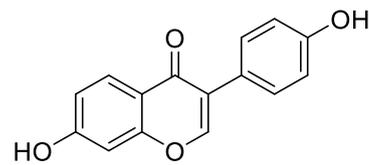
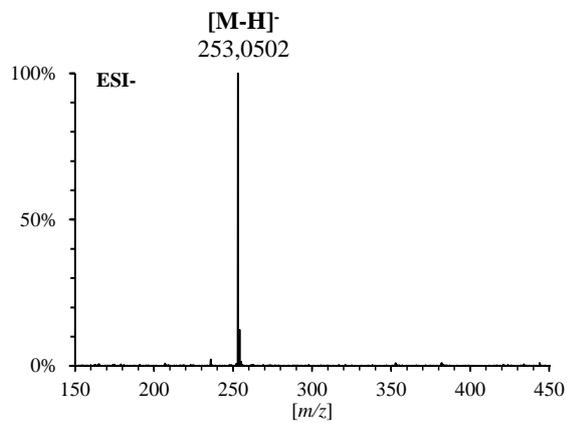
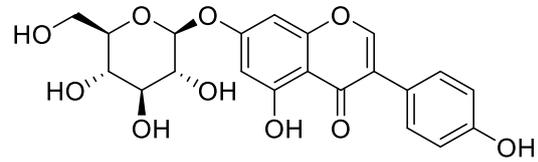
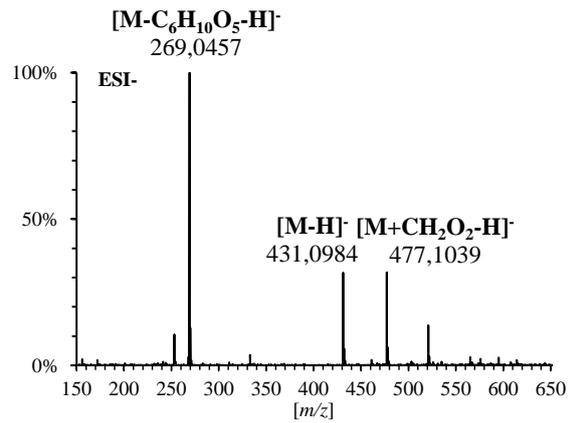


Abbildung 5-6: Massenspektren und Strukturformeln von Genistin (oben), Daidzein (Mitte) und Genistein (unten).

Ob und inwieweit die vermuteten Substanzen zum Fehlgeschmack von Sojaproteinisolaten beitragen kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abgeschätzt werden.

Im Lauf des Projektes sollen jedoch zukünftig weiterführende Experimente zur Aufklärung des bitter-adstringierenden Fehlgeschmacks durchgeführt werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Materialien

6.1.1 Probenmaterial

Tabelle 6-1: Verwendetes Probenmaterial.

<i>Pflanze</i>	<i>Beschreibung/Beschriftung</i>	<i>Spezifikation</i>
Erbse	Erbotin PF Protein: 82y.±2y. Dez. 2013 Gustav Parmentier	Batch: 9123631
Erbse	Pisane (Cosucra) 2014 geöffnet (Erbsenproteinisolat)	
Erbse	Pea Proteine 5005454 Pea Protein Emsland 75 % Erbsen Protein Emsland 75 %	Code: 5005454
Erbse	Lysamin GP 1147355 Pea Protein 78 % Roquette	Code: 1147355 Feed grade!
Erbse	Nutralys S85F 5006541 Pea Protein 78 % (Roquette)	Code: 5006541 Food grade
Soja	Sojaisolat Hersteller: ADM SUPRO XT 219DIP 2013 (Lieferant: Barentz)	
Soja	Sojaisolat Hersteller: CHS Solbar Q742/P 2013 (Lieferant: Triconor)	Lot: NU742080213A
Soja	PRO-FAM®891 Hersteller: ADM Soy Protein	Product Code: 066891 Lot: 13032161

6.1.2 Chemikalien

Alle eingesetzten Materialien weisen, falls nicht anders angegeben, p.a.-Qualität auf. Für analytische Zwecke wird Reinstwasser verwendet, welches mittels einer Milli-Q-Wasser Advantage A 10 Reinigungsanlage (Millipore, Molsheim, Frankreich) gewonnen wurde. Für sensorische Zwecke wird Evian®-Wasser benutzt. Etwaige Verunreinigungen in Aceton, Ethylacetat und Pentan werden vor Benutzung mittels eines Rotationsverdampfers entfernt. Alle kommerziell erworbenen Chemikalien sind in Tabelle 6-2 aufgelistet.

Tabelle 6-2: Verwendete Chemikalien.

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
Aceton	VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Acetonitril, HPLC grade	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Acetonitril, LC-MS grade	Honeywell Speciality Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland
Ameisensäure, 98–100 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylacetat	VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Chloroform-d3	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
9-HODE (10E, 12E), >98 %	Larodan AB, Solna, Schweden
9-HODE (10E, 12Z), ≥98 %	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
13-HODE (9E, 11E), >98 %	Larodan AB, Solna, Schweden
13-HODE (9Z, 11E), ≥98 %	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-Hydroxypalmitinsäure, ≥98 %	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kalilauge, 1 M	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
1-Linoleoylglycerol, ≥97 %	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Linolsäure, ≥99 %	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Linolensäure, ≥99 %	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol, HPLC-grade	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
n-Pentan	VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Pyridin, Anhydrous, 99,8 %	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-Propanol, HPLC grade	Honeywell Speciality Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland
Soyasaponin I, ≥94 %	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

6.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6-3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
Faltenfilter (MN 615 ¼, Ø150 mm)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

NMR-Röhrchen (USC tubes, 178 x 5 mm)		Bruker, Fällanden, Schweiz
Rotilabo®-Rundfilter 111A	Typ	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rollrandschnappdeckelgläser (50 ml, 30 x100 mm, Braunglas)		VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm; 15 mm)		Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland

6.2 Sensorische Methoden

Zur sensorischen Evaluation kommen diverse psychophysikalische Experimente zum Einsatz. Mit Hilfe dieser sollen die Proteinisolate und deren Folgeprodukte sensorisch beurteilt und die bitter-adstringierenden Komponenten lokalisiert werden. Durchgeführt wird die Beurteilung in einem Sensorikraum bei 20 bis 25° C. Vor der Ausübung eines sensorischen Tests werden die Panelisten gebeten, ihren Mundraum mit ca. 20 ml kommerziell erhältlichem Evian®-Wasser zu spülen, welches mit Ameisensäure (1 % v/v in Evian-Wasser®) auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt ist. Eine handelsübliche Nasenklammer soll außerdem die Wahrnehmung nasaler und retronasaler Aromaseindrücke verhindern. Zur Aufnahme der Messwerte findet die FIZZ Sensory Analysis Software (Biosystems, Dijon, Frankreich) Anwendung. Die statistische Auswertung erfolgt zum einen mit dem Calculationmodul von FIZZ, zum anderen durch das Programm Excel 2013 (Microsoft, Redmond, USA).

6.2.1 Sensorikpanel

Die humansensorischen Tests werden von Mitarbeitern des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik der Technischen Universität München durchgeführt. In vorläufigen Experimenten (Ergebnisse nicht dargestellt) wurden die Panelisten ermittelt, die für den bitter-adstringierenden Fehlgeschmack von Erbsen- bzw. Sojaproteinisolaten nicht empfänglich sind. Diese *Non-Taster* werden in den jeweiligen sensorischen Tests nicht zur Beurteilung herangezogen. Erbsenproteinisolate und deren Folgeprodukte werden von 10 bis 14 *Tastern* evaluiert. Zur humansensorischen Beurteilung von Sojaproteinisolaten und deren Folgeprodukten wird ein Panel mit einer Teilnehmerzahl von 16 bis 22 Personen herangezogen.

6.2.2 Geschmacksprofilanalyse eines Referenzproduktes

Damit für sensorische Tests ein Vergleichsprodukt zur optimalen sensorischen Bewertung herangezogen werden kann, werden die Panelisten gebeten ein im Vorfeld ausgewähltes Erbsen- bzw. Sojaprodukt zu bewerten. Dabei handelte es sich um Nutralys S85F 5006541 für Erbsenproteinisolate und Supro XT 219DIP 2013 für Sojaproteinisolate (siehe 6.1.1). Dafür wurden je 6 g Probenmaterial in einen 500 ml Erlenmeyerkolben eingewogen. Dieses wird anschließend mit 100 ml Evian®-Wasser aufgeschlämmt, welches mit Ameisensäure auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt wurde. Um zu verhindern, dass sich ungelöstes Probenmaterial auf dem Boden absetzt, wird die Suspension mittels eines Magnetrührwerks kontinuierlich in Bewegung gehalten.

Für die Geschmacksprofilanalyse der Referenzprodukte werden die entsprechenden Panels (vgl. 6.2.1) zwei Mal an jeweils unterschiedlichen Tagen gebeten die Probe in den Attributen süß, sauer, umami, salzig, bitter, adstringierend und brennend auf einer linienlosen Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) bis 5 (stark wahrnehmbar) zu bewerten. Die statistische Auswertung erfolgt mittels der unter 6.2 beschriebenen Software.

6.2.3 Vergleichende Geschmacksprofilanalyse

Zur sensorischen Bewertung des pH-Wert-Einflusses auf die geschmackliche Wahrnehmung der Referenzprodukte sowie der Evaluierung weiterer handelsüblicher Proteinisolate (vgl. 6.1.1) und Extrakte (vgl. 4.4.3) werden die jeweiligen Panelisten (vgl. 6.2.1) gebeten, das Probenmaterial gegen die Referenz (siehe 4.1, 5.1, und 6.2.2) zu beurteilen. Die Panelisten führen die Sensorik unter den in 6.2 beschriebenen Bedingungen durch und vergleichen dabei die Testlösungen mit der Referenz. Bewertet werden die Proben nach den Attributen süß, sauer, umami, salzig, bitter, adstringierend und brennend auf einer linienlosen Skala von 0 (nicht wahrnehmbar) und 5 (stark wahrnehmbar). Auf der Skala sind die ermittelten Geschmacksintensitäten der Referenz (pH=5,5) zum Vergleich vorgegeben (vgl. 4.1 und 5.1).

6.2.3.1 Einfluss des pH-Werts auf das Geschmacksprofil pflanzlicher Proteinisolate

Zur Prüfung des Einflusses des pH-Werts auf die Wahrnehmung des bitter-adstringierenden Fehlgeschmacks werden je 6 g des entsprechenden Referenzproteinisolats (Nutralys S85F 5006541 bzw. Supro XT 219DIP 2013) in einen Erlenmeyerkolben (500 ml) eingewogen und mit 100 ml Evian®-Wasser verschiedener pH-Werte versetzt. Die Einstellung des pH-Werts erfolgt dabei mit Ameisensäure und 1 %iger Kalilauge (v/v in Evian®). Untersucht wird dabei ein pH-Intervall von 3,5 bis 7,5. Dieses wird als repräsentativ für die jeweiligen

Lebensmittelmatrixen erachtet. Die Suspensionen werden gemäß 6.2.2 mittels eines Magnetrührwerkes für die Dauer der Sensorik aufgeschlämmt und der Versuch gemäß 6.2.3 durchgeführt.

6.2.3.2 Geschmacksprofile handelsüblicher Proteinisolate

Um das Geschmacksprofil handelsüblicher pflanzlicher Proteinisolate (vgl. 6.1.1) zu bestimmen, werden 6 g des zu untersuchenden Proteinisolats in einen 500 ml Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 100 ml Evian® (pH=5,5) versetzt. Analog wird mit der jeweiligen Referenz (Nutralys S85F 5006541 bzw. Supro XT 219DIP 2013) verfahren. Die Durchführung der Sensorik erfolgt gemäß 6.2.3.

6.2.3.3 Geschmacksprofile von Extrakten

Die durch sequentielle Lösungsmittelextraktion gewonnenen und aufbereiteten Fraktionen (siehe 5.4.1) werden entsprechend ihrer natürlichen Konzentration in einen Erlenmeyerkolben (500 ml) eingewogen und mit 100 ml Evian®-Wasser versetzt, welches mit Ameisensäure auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt ist. Nachfolgend wird in einer Zweifachbestimmung das Geschmacksprofil des Extraktes I nach 6.2.2 ermittelt. Der Test wird dann nach 6.2.3 durchgeführt. Dabei ist das Profil des Extraktes I als Referenz für die Panelisten vorgegeben.

6.2.4 Untersuchung des unlöslichen Extraktionsrückstandes auf Fehlgeschmack

Nach vollständiger Extraktion (siehe 6.3) soll der unlösliche Rückstand auf seinen noch vorhandenen Fehlgeschmack hin untersucht werden. Folgende Tests finden dabei Anwendung.

6.2.4.1 3-AFC-Test

Für eine Doppelbestimmung werden je drei Proben in einem Erlenmeyerkolben vorbereitet. Dabei handelt es sich bei einer um das unbehandelte Proteinisolat (in Evian®, 6 g/100 ml, pH=5,5) bei den anderen beiden um den unlöslichen Extraktionsrückstand (in Evian®, natürliche Konzentration, pH=5,5). Alle Proben werden unter ständigem Rühren mittels eines Magnetrührwerkes aufgeschlämmt. Um zu verhindern, dass die Proben optisch unterschieden werden können, werden die Erlenmeyerkolben mit handelsüblicher Alufolie eingewickelt. Die Proben werden anschließend in Form eines Dreiecks angeordnet.

Die Panelisten werden zunächst gebeten ihren Mundraum mit Evian® (pH=5,5) zu spülen und anschließend die Proben in beliebiger Reihenfolge zu verkosten. Nachfolgend sollen sie entscheiden, welche der Proben sie als bitterste empfinden.

6.2.4.2 Konsenspanel

Zunächst werden sechs Panelisten für den Test ausgewählt. Bei ihnen handelt es sich um Tester mit guten sensorischen Fähigkeiten und hoher Reproduzierbarkeit. Die Panelisten werden zunächst gebeten ihren Mundraum mit Evian® (pH=5,5) zu spülen und anschließend das unbehandelte Proteinisolat (in Evian®, 6 g/100 ml, pH=5,5) mit dem Extraktionsrückstand (in Evian®, natürliche Konzentration, pH=5,5) vergleichsweise zu verkosten. Danach bewerten die Panelisten die Proben hinsichtlich ihres Fehlgeschmacks.

6.2.5 Geschmacksverdünnungsanalyse

Durch die Geschmacksverdünnungsanalyse (*Frank et al., 2001*) soll herausgefunden werden, welche der Fraktionen (siehe 6.4.1) und Subfraktionen (siehe 6.4.2) die höchste Geschmacksaktivität aufweisen.

Dazu werden die per MPLC-Trennung (siehe 6.4.1) gewonnenen Fraktionen entsprechend ihrer vierfachen natürlichen Konzentration in ein Rollrandschnappdeckelglas überführt und mit 40 ml Evian® (pH=5,5) versetzt. Subfraktionen aus der HPLC-Auftrennung (siehe 6.4.2) werden komplett in 40 ml Evian® (pH=5,5) aufgenommen und analog behandelt. Die Gefäße werden verschlossen und 10 min im Ultraschallbad gelöst.

Die Lösungen werden anschließend komplett in je ein Plastikgefäß (40 ml) überführt. 20 ml dieser Lösungen werden nun in ein weiteres Plastikgefäß pipettiert und diese schließlich schrittweise 1+1 mit Evian® (pH=5,5) verdünnt (siehe Abbildung 6-1).

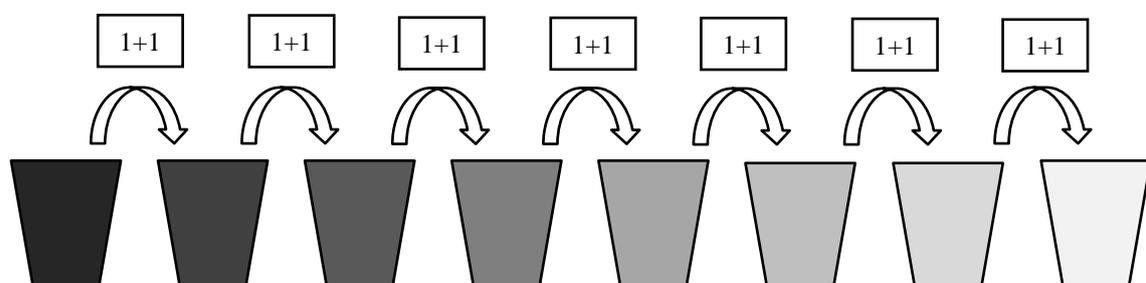


Abbildung 6-1: Verdünnungsreihe der Geschmacksverdünnungsanalyse.

Die Lösungen werden anschließend in Reagenzgläser aus Braunglas überführt und den Panelisten in aufsteigender Konzentration zur Verkostung bereitgestellt. Nach Spülung des Mundraums mit Evian® (pH=5,5) werden die Panelisten gebeten jede Verdünnungsstufe im Duo-Test gegen Evian® (pH=5,5) hinsichtlich ihres Geschmacks zu bewerten. Auf diese Weise wird die Verdünnungsstufe ermittelt, die für die Panelisten noch wahrnehmbar ist. Aus dem arithmetischen Mittelwert all dieser wahrnehmbaren Verdünnungsstufen lässt sich der Geschmacksverdünnungsfaktor (GV-Faktor) der einzelnen Fraktionen und Subfraktionen berechnen. Dazu wird das arithmetische Mittel der Verdünnungsstufen zur Basis 2 potenziert.

6.2.6 Schwellenwertsbestimmung

Zur Einschätzung des Beitrags der isolierten Verbindungen zur Bitterkeit des Isolats werden für diese Geschmacksschwellenwerte ermittelt. Dazu werden definierte Mengen an Substanz (Tabelle 6-4) mit jeweils 20 ml 3 %igem ethanolischen Evian® (v+v) versetzt, in ein Rollrandrandschnappdeckelglas überführt und das Gefäß verschlossen. Anschließend wird die Lösung 10 min im Ultraschallbad behandelt. 10 ml dieser Lösung werden dann in ein Plastikgefäß (40 ml) überführt. Diese ist die niedrigste Verdünnungsstufe. Die verbliebenen 10 ml werden in ein weiteres Plastikgefäß überführt und analog 6.2.5 (Abbildung 6-1) sukzessive 1+1 mit 3 %igem ethanolischen Evian® verdünnt.

Tabelle 6-4: Einwaage der Geschmacksstoffe zur Bestimmung der Schwellenwerte

Bezeichnung	Substanz	Herkunft	Einwaage [mg]
I-11-16-4	2-Hydroxypalmitinsäure	kommerzieller Standard	10,0
I-11-16-5	2-Hydroxyölsäure	isolierte Substanz	4,4

Anschließend werden die Lösungen in Braunglasreagenzgläser überführt und den Panelisten in aufsteigender Konzentration gegen 3 %ige Evian®-Lösung (v+v) zur Sensorik bereitgestellt. In Anlehnung an die Methodik von Wieser und Belitz (1975) sowie der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsmethoden nach § 64 LFGB (ASU L 00.90-9, 2014) erfolgt die Verkostung im Duo-Test.

Der Schwellenwert eines Panelisten (c_p) berechnet sich aus dem geometrischen Mittelwert der ersten richtig wahrgenommenen Konzentration (c_1) und der davor bewerteten Konzentration (c_0). Der Schwellenwert des gesamten Panels (c_s) kann nun aus dem geometrischen Mittel der Einzelpersonen gebildet werden (ASU L 00.90-9, 2014).

$$c_p = \sqrt{c_1 \cdot c_0}$$

mit

c_p ... Schwellenwert des Panelisten

c_1 ... erste richtige Konzentration

c_0 ... letzte falsche Konzentration

$$c_s = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n c_{p,i}}$$

c_s ... Schwellenwert des Panels

n ... Anzahl der Panelmitglieder

6.3 Sequentielle Lösungsmittlextraktion und anschließende Aufarbeitung pflanzlicher Proteinisolate

Zur Extraktion geschmacksaktiver Verbindungen werden die Proteinisolate mit Lösungsmitteln abnehmender Polarität extrahiert und diese anschließend für sensorische (vgl. 6.2) und analytische (vgl. 6.5.1) Zwecke entsprechend aufgearbeitet.

6.3.1 Sequentielle Lösungsmittlextraktion

Eine schematische Darstellung des Verfahrens ist 4.4.1 (siehe Abbildung 4-4) zu entnehmen. Nach exakter Einwaage von 340 g Proteinisolat in ein Becherglas (5000 ml) wurden 1400 ml eines MeOH/H₂O-Gemischs zugefügt und dieses 30 min mit einem Magnetrührwerk kontinuierlich aufgeschlämmt. Für Erbsenproteinisolate wird als Extraktionsmittel ein MeOH/H₂O-Gemisch mit dem Verhältnis 1+1 (v+v) gewählt. Aufgrund der starken Gelbildungsfähigkeiten einiger Sojaproteinisolate, wird zur Extraktion der wässrige Anteil auf ein Verhältnis von 7+3 MeOH/H₂O (v+v) gesenkt. Anschließend wird das Gemisch mittels einer Saugflasche und eines Büchnertrichters durch einen Rundfilter geleitet und der Vorgang mit dem Extraktionsrückstand zweifach wiederholt. Die wässrig-methanolischen Extrakte werden erneut mittels eines Rundfilters filtriert und gesammelt.

Der Vorgang wird im Folgenden mit je 1400 ml MeOH, MeOH/Aceton (6+4; v+v), Ethylacetat und Pentan als Extraktionsmittel je drei Mal wiederholt.

Die gewonnenen Extrakte wurden am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der MeOH/H₂O-Extrakt des Erbsenproteinisolats wurde aufgrund seiner Schaumaktivität mittels eines Schaumbruchadapters evaporiert. Die Konzentrate wurden mit Reinstwasser versetzt, lyophilisiert und die Ausbeute gravimetrisch bestimmt. Zur gründlichen Entfernung von Lösungsmittelresten wird dieser Vorgang mit dem Extraktionsrückstand zweifach durchgeführt.

Die Ausbeuten der einzelnen Durchführungsschritte sind in Anhang A.1 zusammengefasst.

6.4 Chromatographische Aufarbeitung

Im Zuge dieser Arbeit werden zur Abreicherung nicht- oder weniger geschmacksaktiver Substanzen nachfolgende flüssigkeitschromatographische Methoden verwendet.

6.4.1 MPLC-ELSD

Die nach 6.3.1 gewonnen geschmacksaktiven Extrakte wurden mittels Medium Pressure Liquid Chromatography aufgetrennt.

6.4.1.1 Extraktbearbeitung

Der Extrakt wird mit so viel 0,1%iger Ameisensäure (v+v) versetzt, dass sich eine Konzentration von 3 g/ml ergibt. Die Lösung wird in Rollrandschnappdeckelgläser aliquotiert. Diese werden verschlossen und 15 min im Ultraschallbad homogenisiert.

6.4.1.2 Messparameter

Die Extrakte (siehe 6.3.1) werden mit den folgenden Parametern analysiert:

Steuereinheit	Kontrolleinheit C-620 (Büchi, Flawil, Schweiz)
Pumpen:	C-605 Pumpenmodule (Büchi, Flawil, Schweiz)
Fraktionssammler:	Fraktionssammler C-660 (Büchi, Flawil, Schweiz)
Injektionsventil:	6-Wege-Ventil (Büchi, Flawil, Schweiz)
Probenschleife:	20 ml
Detektor:	Split-ELS-Detektor Sedex 80 (ERC GmbH, Riemerling) Temperatur: 40 C; Gain: 8
Kartusche:	Innendurchmesser [mm] / Länge [mm] (40/150), (Büchi, Flawil, Schweiz) gefüllt mit RP18-Material (LiChroprep®, 25–40 µm (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Injektionsvolumen:	5 ml
Software:	Sepacore Control Chromatography Software, Version 1.0 (Büchi, Flawil, Schweiz)
Eluentensystem:	Eluent A: 0,1 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) Eluent B: MeOH

Der Gradient ist in Tabelle 6-5 aufgeführt.

Tabelle 6-5: Gradientensystem der verwendeten MPLC-Methode.

<i>Zeit [min]</i>	<i>Fluss [ml/min]</i>	<i>A [%]</i>	<i>B [%]</i>
0,00	40,0	100	0
7,00	40,0	100	0
8,00	40,0	90	10
13,00	40,0	90	10
14,00	40,0	80	20
19,00	40,0	80	20
20,00	40,0	70	30
25,00	40,0	70	30
26,00	40,0	60	40
31,00	40,0	60	40
32,00	40,0	50	50
37,00	40,0	50	50
38,00	40,0	40	60
43,00	40,0	40	60
44,00	40,0	30	70
49,00	40,0	30	70
50,00	40,0	20	80
55,00	40,0	20	80
56,00	40,0	10	90
61,00	40,0	10	90
62,00	40,0	0	100
92,00	40,0	0	100

6.4.2 Präparative HPLC-ELSD

Zur weiteren Aufreinigung der MPLC-Fraktionen (vgl. 6.4.1) werden die Proben weiter flüssigkeitschromatographisch per präparativer HPLC aufgereinigt.

6.4.2.1 Probenaufarbeitung

In etwa 340 mg der Fraktion 11 (siehe 4.4.4) werden in ein Rollrandschnappdeckelglas eingewogen und in 6 ml eines Gemischs aus Wasser und ACN (6+4; v+v) gelöst. Anschließend wird das Gefäß verschlossen und 15 min im Ultraschallbad homogenisiert.

6.4.2.2 Messparameter

Die Proben wurden mit dem folgenden HPLC-System analysiert:

Pumpen:	PU-2080 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Injektionsventil:	Mehrkanalventil Rheodyne 7725i (IDEX health & science, Wertheim, Deutschland)
Probenschleife:	2 ml
Degaser:	DG-2080-53 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Detektor:	Split-ELS-Detektor Sedex 85 (ERC GmbH, Riemerling) Temperatur: 40 C; Gain: 8
Säule:	Synergi 4u Hydro-RP 80A, 250 x 21,2 mm (Phenomenex, Torrance, USA)
Injektionsvolumen:	300 µl
Software:	Chrompass 1.9.302.1124 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Eluentensystem:	Eluent A: 0,1 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) Eluent B: ACN

Der Gradient ist in Tabelle 6-6 zusammengefasst.

Tabelle 6-6: Gradientensystem der verwendeten präparativen HPLC-Methode.

<i>Zeit [min]</i>	<i>Fluss [ml/min]</i>	<i>A [%]</i>	<i>B [%]</i>
0,00	21,0	60	40
2,00	21,0	60	40
5,00	21,0	50	50
25,00	21,0	0	100
28,00	21,0	0	100
33,00	21,0	60	40
40,00	21,0	60	40

6.4.3 Semipräparative HPLC-ELSD/UV

Zur Isolierung und Identifizierung der Fehlgeschmackstoffe sollen die HPLC-Fractionen (vgl. 6.4.2) final im semipräparativen Maßstab aufgetrennt werden.

6.4.3.1 Probenaufarbeitung

Die nach 6.4.2 gewonnenen Fraktionen werden am Rotationsverdampfer bis fast zur Trockne eingengt. Anschließend werden die Fraktionen jeweils in 20 ml eines Gemischs aus ACN und Isopropanol (3+2; v+v) aufgenommen, 15 min im Ultraschallbad homogenisiert und in ein Rollrandschnappdeckelglas membranfiltriert.

6.4.3.2 Messparameter

Die Auftrennung erfolgt mit den nachfolgenden Parametern:

Pumpen:	PU-2080 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Injektionsventil:	Mehrkanalventil Rheodyne 7725i (IDEX health & science, Wertheim, Deutschland)
Probenschleife:	2 ml
Degaser:	DG-2080-53 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Detektoren:	Split-ELS-Detektor Sedex 85 (ERC GmbH, Riemerling) Temperatur: 40 C; Gain: 7 MD-2010 Plus Multiwavelength Detector (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Injektionsvolumen:	1,5 ml
Software:	Chrompass 1.9.302.1124 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)

Für die Isolierung der Fehlgeschmackstoffe kommen diverse Trennsysteme zum Einsatz. Diese sind nachfolgend angegeben.

Trennsystem 1 (I-11-16 und I-11-17)

Säule:	Luna® 5 µm C5 100 Å; 250 × 10 mm (Phenomenex, Torrance, USA)
Eluentensystem:	Eluent A: 0,1 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) Eluent B: ACN/Isopropanol/Ameisensäure (600+400+0,1; v+v+v)

Der Gradient von Trennsystem 1 ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 6-7: Gradientensystem von Trennsystem 1 der verwendeten semipräparativen HPLC-Methode.

Zeit [min]	Fluss [ml/min]	A [%]	B [%]
0,00	4,7	26	74
15,00	4,7	26	74
19,00	4,7	0	100
26,00	4,7	0	100
29,00	4,7	26	74
33,00	4,7	26	74

6.5 Massenspektrometrische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit kommen diverse massenspektrometrische Experimente zum Einsatz. Diese dienen zum einen der Bestimmung der molekularen Masse sowie der Elementarzusammensetzung einzelner Verbindungen und zum anderen der Detektion charakteristischer Fragmentmuster.

6.5.1 UHPLC-ToF-MS

Um Extrakte, Fraktionen, Subfraktionen und isolierte Verbindungen auf literaturbekannte Bitterstoffe und Adstringenzen zu screenen und exakte Elementarzusammensetzungen zu berechnen, werden diese nach Aufarbeitung zunächst flüssigkeitschromatographisch aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch detektiert.

6.5.1.1 Probenaufarbeitung

Die Proben werden in einem Rollrandschnappdeckelglas auf eine Konzentration von 1 mg/ml in einem Gemisch aus ACN/H₂O (1+1; v+v) gelöst. Das Behältnis wird verschlossen und einige Sekunden homogenisiert (Vortex, Stufe 4). Die Lösung wird durch einen Spritzenvorsatzfilter in ein UV-undurchlässiges Vial filtriert und verschlossen.

6.5.1.2 Messparameter

Die aufgearbeiteten Proben werden mit den nachfolgenden Parametern untersucht:

Massenspektrometer:	Synapt G2-S HDMS Time of Flight mass spectrometer (Waters, Manchester, UK)
UHPLC-System:	Acquity UPLC Core system (Waters, Bedford, USA)
Ionisation:	Electrospray Ionization (ESI)

Messmodus:	positiv+negativ (High Resolution Mode, MS Mode)
Kapillarspannung:	2,5 kV (positiver Messmodus) und 1,7 kV (negativer Messmodus)
Sampling Cone:	50 V
Quellentemperatur:	150 °C
Desolvationstemperatur:	450 °C
Cone Gas:	2 l/h (positiver Messmodus) und 30 l/h (negativer Messmodus)
Desolvation Gas:	800 l/g
Referenzierung:	Natriumformiat
Säule:	Acquity UPLC® BEH C ₁₈ 1,7 µm, 150 x 2.1 mm (Waters, Bedford, USA)
Injektionsvolumen:	1 µl
Software:	MassLynx v4.1 SCN 851 (Waters, Bedford, USA)
Eluentensystem:	Eluent A: 0,1 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) Eluent B: 0,1 % Ameisensäure in ACN (v/v)

Das Gradientensystem wird nachfolgend in Tabelle 6-8 aufgeführt.

Tabelle 6-8: Gradientensystem der verwendeten UHPLC-ToF-MS-Methode.

<i>Zeit [min]</i>	<i>Fluss [ml/min]</i>	<i>A [%]</i>	<i>B [%]</i>
0,00	0,4	50	50
4,00	0,4	0	100
4,50	0,4	0	100
4,60	0,4	50	50
5,00	0,4	50	50

6.5.2 MS/MS-Direktinjektion

Mit Hilfe von Massenspektren können Aussagen über strukturelle Merkmale der isolierten Verbindungen gewonnen werden. Dazu werden die aufgearbeiteten Substanzen direkt ins System injiziert und die Massenspektren ohne chromatographische Vortrennung generiert.

6.5.2.1 Probenaufarbeitung

Die nach 6.5.1.1 hergestellten Lösungen werden 1+100000 (v+v) mit ACN verdünnt, in ein Braunglasvial membranfiltriert und stehen dann zur Messung bereit.

6.5.2.2 Messparameter

Die Proben werden über eine Injektionsschleife infundiert und im *Full-Scan*-Modus bei einem Bereich von $m/z = 50-1200$ analysiert. Die Spektren werden dann bei variablem *Declustering Potential* im Bereich zwischen 0 und 100 V im positiven Messmodus bzw. zwischen 0 und -100 V im negativen Messmodus erfasst. Die Fragmentierungsmuster ausgewählter Analytionen werden anschließend mit variabler Kollisionsenergie zwischen 5 und 120 V im positiven Modus und 5 und -120 V im negativen Modus detektiert. Die Messparameter sind nachfolgend angegeben.

Massenspektrometer:	API 4000 QTrap®; Linear Ion Trap Quadrupole Mass Spectrometer (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland)
Ionisation:	Electrospray Ionization (ESI)
Messmodus	positiv+negativ
Scan Typ:	Product Ion Scan (MS2)
Kollisionsenergie:	0 – 100 V (ESI positiv) -100 – 0 V (ESI negativ)
Software:	Analyst 1.6.2 (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland)

6.5.3 GC-MS silylierter Hydroxyfettsäuren

Damit die Position von Hydroxyfunktionen im Molekül isolierter Substanzen aufgeklärt werden kann, werden diese zunächst derivatisiert und ihre Fragmentspektren anschließend in einem GC-MS-System generiert.

6.5.3.1 Silylierung von Hydroxyfettsäuren

In Anlehnung an *Gao et al. (2001)* und *Spreng (2018)* werden 2 mg der gefriergetrockneten Substanz in 2 ml Pyridin gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Lösung werden dann 250 µl Trimethylchlorsilan und 500 µl Hexamethyldisilazan gegeben. Nach einer Reaktionsdauer von 20 min wird der Ansatz für 5 min bei 4400 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert (Centrifuge 5702, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wird in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und unter Stickstoffstrom im Wasserbad bei 40 °C vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in 1 ml Dichlormethan aufgenommen und erneut 5 min bei 4400 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird direkt für die GC-Messung verwendet.

6.5.3.2 Messparameter

Für die Aufnahme der Massenspektren wird folgendes Messsystem verwendet.

GC-System	Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland)
Autosampler	Combi PAL (CTC Analytics, Combi PAL System, Zwingen, Schweiz)
Injektionstechnik	PTV-Split
Injektionsvolumen	2 µl
Split Flow	24 mL/min (Split Ratio: 20)
Trägergas	Helium (1,2 mL/min)
Kapillarsäulen	DB-1701, 30 m x 0,25 mm ID, 0.25 µm Filmdicke (J&W Scientific, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Temperaturprogramm	40 °C (2 min), 10 °C/min, 240 °C (3 min)
Detektor	Quadrupol-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland)
Ionisationsmodus	Elektronenstoßionisation (70 eV)
Software	Xcalibur 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland)

6.6 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Strukturaufklärung der Fehlgeschmackstoffe werden NMR-Spektren aufgenommen. Dies erfolgt wahlweise mit einem 400 MHz Bruker DRX Spektrometer (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) oder einem 500 MHz Bruker Avance III Spektrometer (Bruker, Rheinstetten, Deutschland). Dazu werden die Substanzen in 600 µl CDCl₃ gelöst, in je ein NMR-Röhrchen (178 x 5 mm, USC tubes, Bruker, Fällanden, Schweiz) überführt und bei 298,2 K (400 MHz) bzw. 300 K (500 MHz) gemessen. Die Geräteparameter sind nachfolgend aufgelistet:

Probenkopf:	500 MHz: Triple Resonance TCI Cryo Probenkopf, Broadband Inverse BBI, ATM Automated Tuning and Matching (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) 400 MHz: Broadband Observe BBFOplus Probenkopf (Bruker, Rheinstetten, Deutschland)
Automatisierung:	BACS 60

Software: Topspin 2.1 (500 MHz) bzw. 3.2 (400 MHz) (Bruker, Rheinstetten, Deutschland); MestreNova ® 10.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spanien)

Alle Signale werden auf das verwendete Lösungsmittel referenziert (für CDCl_3 : $\delta [^1\text{H}] = 7,26 \text{ ppm}$; $\delta [^{13}\text{C}] = 77 \text{ ppm}$). Die Spektren werden mit Hilfe der Software MestreNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spanien) ausgewertet. Eine genaue Signalzuordnung erfolgt dabei durch DEPT-, COSY-, HSQC-, HMBC-, und H2BC-Experimente und durch Vergleich mit Referenzspektren.

6.6.1 $^1\text{H-NMR}$

Das $^1\text{H-NMR}$ gibt Aufschluss über die chemische Verschiebung (δ in ppm) und die Kopplungskonstanten (J in Hz) benachbarter Protonen. Aus den $^1\text{H-Spektren}$ lässt sich die chemische Umgebung der Protonen im Molekül ableiten (Hesse *et al.*, 2005). Des Weiteren werden alle Signale integriert, um daraus ihre Protonenanzahl zu bestimmen. Von Signalen mit erkennbarer Multiplizität (s, d, t) wird dabei der Signalschwerpunkt ermittelt. Multipletts (m) von Signalüberlagerungen mehrerer nicht-äquivalenter Protonen werden in Bereichen angegeben.

6.6.2 $^{13}\text{C-NMR}$

Durch Aufnahme von $^{13}\text{C-Spektren}$ kann die Anzahl der Kohlenstoffatome im Molekül ermittelt werden. Da der natürliche Anteil des Kohlenstoffisotops ^{13}C rund 1,1 % beträgt, erfolgt zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses eine $^1\text{H-Breitbandentkopplung}$. Durch diesen Entkopplungseffekt erscheinen alle Signale als Singulett (Friebolin, 1999 und Hesse *et al.*, 2005).

6.6.3 Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT)

Das DEPT-Experiment (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) liefert ein-dimensionale $^{13}\text{C-Spektren}$, mit denen zwischen quartären C-Atomen sowie CH-, CH_2 - und CH_3 -Gruppen unterschieden werden kann. CH- und CH_3 -Gruppen werden dabei mit gleichem Vorzeichen detektiert. CH_2 -Gruppen führen zu Signalen mit entgegengesetztem Vorzeichen. Quartäre Kohlenstoffatome sind nicht detektierbar (Friebolin, 1999).

6.6.4 Homonukleare $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Verschiebungskorrelation (COSY)

Mittels des COSY-Experiments (*Correlation Spectroscopy*) wird ein zweidimensionales NMR-Spektrum erhalten, dessen Diagonale dem ^1H -Spektrum des Moleküls entspricht. Signale außerhalb dieser Diagonalen entsprechen geminal (2J ($^1\text{H}, ^1\text{H}$)) und vicinal (3J ($^1\text{H}, ^1\text{H}$)) verbundenen Protonen (*Friebolin, 1999* und *Hesse et al., 2005*).

6.6.5 Heteronukleare $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Verschiebungskorrelation (HSQC)

Aus dem 2D-Spektrum des HSQC-Experiments (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) lassen sich 1J -Kopplungen zwischen bindenden Wasserstoff- (^1H) und Kohlenstoffatomen (^{13}C) entnehmen (*Hesse et al., 2005*). Kopplungen von CH_2 -Gruppen werden dabei mit negativen Vorzeichen detektiert. Im Spektrum werden diese Signale mit einer anderen Farbe dargestellt. Im Falle von MestreNova $\text{\textcircled{R}}$ 10.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spanien) ist diese Färbung blau. Dies ermöglicht die Unterscheidung gegenüber den rot dargestellten primären und tertiären Kohlenstoffatomen.

6.6.6 Heteronukleare $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Long-Range-Verschiebungskorrelation (HMBC)

Mit Hilfe von zweidimensionalen HMBC-Spektren (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) können $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Kopplungen über mehrere Bindungen gemessen werden. Dabei können 2J - ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) bis 4J -Kopplungen ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) detektiert werden. 1J -Kopplungen ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) werden unterdrückt (*Friebolin, 1999*). Durch HMBC-Experimente ist es somit möglich auch quartäre Kohlenstoffatome zu detektieren.

6.6.7 Heteronukleare $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Two-Bond-Verschiebungskorrelation (H2BC)

Zur Strukturaufklärung werden H2BC-Experimente (*Heteronuclear 2 Bond Correlation*) durchgeführt. Bei diesen Messungen werden im Gegensatz zum HMBC heteronukleare 3J - ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) und 4J -Kopplungen ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) unterdrückt. 2J -Korrelationen ($^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) hingegen werden verstärkt (*Nyberg et al., 2005*).

Forschungsstelle 2

7 Funktionelle Charakterisierung kommerziell verfügbarer Isolate (AP 1b)

Die Zusammensetzung der untersuchten Isolate ist in Tabelle 7-1 dargestellt. Die Isolate der unterschiedlichen Hersteller unterschieden sich insbesondere in den Gehalten an Fett und Asche. Die Proteingehalte und Trockensubstanzgehalte der Isolate waren insgesamt sehr ähnlich.

Tabelle 7-1: Zusammensetzung der kommerziellen Isolate

Isolatbezeichnung	Pflanze	TS (%)	Protein (% d. TS)		Asche (% d. TS)	Fett (% d. TS)
			N*6,25	N*realer Faktor		
SuproXT219DIP (ADM)	Soja	95,3	90,4	82,5	n.b.	n.b.
Solbar Q742/P (CHS)	Soja	94,9	92,1	84,0	3,9	4,5
Solbar Q910IP (CHS)	Soja	94,3	94,4	86,1	3,8	4,0
Solbar Q920IP (CHS)	Soja	95,5	94,5	86,2	3,3	4,2
Unisol NRG (Vitablend)	Soja	92,6	92,1	84,0	4,9	1,9
PeaProteine (Emsland)	Erbse	92,9	85,1	74,9	3,2	9,5
Lysamin GP (Roquette)	Erbse	93,1	86,5	76,1	3,7	8,8
Nutralys S85F (Roquette)	Erbse	93,0	84,4	74,3	4,7	8,7
Erbotin PF (Gustav Parmentier)	Erbse	92,2	84,0	73,9	5,8	7,0
Pisane M9 (Cosucra)	Erbse	93,4	84,9	74,7	5,1	7,7

Isolatbezeichnung	Pflanze	TS (%)	Protein (% d. TS)		Asche (% d. TS)	Fett (% d. TS)
			N*6,25	N*realer Faktor*		
Teutexx Isolexx (Teutoburger Ölmühle)	Raps	96,7	89,2	80,0	2,6	7,0
BioExx Isolexx 2013_02_25 (Teutoburger Ölmühle)	Raps	94,4	95,7	85,8	1,2	2,4
BioExx Isolexx 2013_02_11 (Teutoburger Ölmühle)	Raps	94,4	80,9	72,5	3,0	7,2
Isolexx 2013-05-21 (Teutoburger Ölmühle)	Raps	95,4	92,9	83,2	0,9	3,1
UF-Protein (Fraunhofer IVV)	Raps	95,1	90,0	80,6	2,6	2,0
IEP-Protein (Fraunhofer IVV)	Raps	94,9	87,4	78,3	6,2	3,0
UF-Protein 2 (Fraunhofer IVV)	Raps	93,3	73,7	66,0	11,0	2,2

Neben der Zusammensetzung wurden die funktionellen Eigenschaften (Proteinlöslichkeit pH 3 bis pH 9, Emulgierkapazität, Wasser- und Ölbindevermögen) untersucht. Zu Vergleichszwecken wurde die Löslichkeit bei pH 7 herangezogen. Diese ist zusammen mit den übrigen funktionellen Eigenschaften Tabelle 7-2 zu entnehmen. Die zu erkennenden Unterschiede zwischen den verschiedenen Isolaten sind dabei höchstwahrscheinlich auf die Herstellungsmethoden zurückzuführen.

Die verschiedenen kommerziellen Isolate wiesen teilweise deutliche Unterschiede in ihren funktionellen Eigenschaften auf. Alle Sojaproteinisolate hatten Emulgierkapazitäten zwischen 510 und 630 mL/g. Die untersuchten Erbsenproteinisolate hingegen hatten alle, mit Ausnahme des Pisane M9 (Cosucra), nur geringe Emulgierkapazitäten. Die Rapsproteinisolate hatten die höchsten Emulgierkapazitäten aller untersuchten Isolate.

Darüber hinaus wurden in Abstimmung mit dem Projektbegleitenden Ausschuss die Partikelgrößenverteilungen der kommerziellen Isolate untersucht (Tabelle 7-3). Ziel dabei war, zu klären, inwieweit die unterschiedlichen Ergebnisse der Funktionalitätsbeurteilungen ggf. auf Unterschiede in den Partikelgrößenverteilungen zurückzuführen sind.

Tabelle 7-2: Proteinlöslichkeit bei pH 7, Emulgierkapazitäten, Wasserbindevermögen und Ölbindevermögen der untersuchten Proteinisolate

Isolat	Proteinlöslichkeit bei pH 7	Emulgierkapazität [mL/g]	Wasserbindevermögen [g/g]	Ölbindevermögen [mL/g]
SuproXT219DIP (ADM)	50,3 ± 0,8	525 ± 10	1,7	1,3 ± 0,1
Solbar Q742/P (CHS)	48,4 ± 2,6	510 ± 5	1,3	1,1 ± 0,1
Solbar Q910IP (CHS)	14,1 ± 0,1	620 ± 15	n.m.	1,3 ± 0
Solbar Q920IP (CHS)	11,0 ± 0,1	630 ± 5	n.m.	1,5 ± 0
Unisol NRG (Vitablend)	18,4 ± 0,1	600 ± 5	n.m.	1,7 ± 0
PeaProteine (Emsland)	4,3 ± 0,8	≤ 125	2,0 ± 0	0,8 ± 0
Lysamin GP (Roquette)	3,9 ± 0	≤ 125	2,4 ± 0,1	1,0 ± 0
Nutralys S85F (Roquette)	13,1 ± 0,3	365 ± 0	5,4 ± 0,1	1,3 ± 0
Erbotin PF (Gustav Parmentier)	14,9 ± 0,3	295 ± 0	3,4 ± 0,1	1,2 ± 0
Pisane M9 (Cosucra)	12,6 ± 1,9	870 ± 20	5,4 ± 0,3	1,6 ± 0,1
Teutexx Isolexx (Teutoburger Ölmühle)	90,0 ± 0,1	690 ± 5	0,4 ± 0,1	2,6 ± 0,1
BioExx Isolexx 2013_02_25 (Teutoburger Ölmühle)	93,2 ± 0,5	750 ± 5	n.m.	1,5 ± 0
BioExx Isolexx 2013_02_11 (Teutoburger Ölmühle)	79,5 ± 0,3	695 ± 0	0,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Isolexx 2013-05-21 (Teutoburger Ölmühle)	93,8 ± 1,2	750 ± 5	0,4 ± 0,1	1,8 ± 0
UF-Protein (Fraunhofer IVV)	84,3 ± 0,9	740 ± 10	0,9 ± 0,1	n.m.
IEP-Protein (Fraunhofer IVV)	7,0	310 ± 5	3,1 ± 0,2	0,7 ± 0,1
UF-Protein 2 (Fraunhofer IVV)	76,6	690 ± 10	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1

Tabelle 7-3: Partikelgrößen der kommerziellen Isolate

Isolatbezeichnung	Pflanze	Mittelwert D(0,1) (µm)	Mittelwert D(0,5) (µm)	Mittelwert D(0,9) (µm)
SuproXT219DIP (ADM)	Soja	18	81	164
Solbar Q742/P (CHS)	Soja	12	41	99
Solbar Q910IP (CHS)	Soja	19	76	197
Solbar Q920IP (CHS)	Soja	13	65	191
Unisol NRG (Vitablend)	Soja	21	64	132
PeaProteine (Emsland)	Erbse	50	177	460*
Lysamin GP (Roquette)	Erbse	9	41	104
Nutralys S85F (Roquette)	Erbse	28	109	233
Erbotin PF (Gustav Parmentier)	Erbse	10	35	109
Pisane M9 (Cosucra)	Erbse	9	40	109
Teutexx Isolexx (Teutoburger Ölmühle)	Raps	10	34	91
BioExx Isolexx 2013_02_25 (Teutoburger Ölmühle)	Raps	28	100	209
BioExx Isolexx 2013_02_11 (Teutoburger Ölmühle)	Raps	32	95	187
BioExx Isolexx 2013_05_21 (Teutoburger Ölmühle)	Raps	31	101	199
UF-Protein (Fraunhofer IVV)	Raps	4	17	41
IEP-Protein (Fraunhofer IVV)	Raps	1	6	18
UF-Protein 2 (Fraunhofer IVV)	Raps	5	22	51

* geringe Anzahl an Partikel > 955 µm (oberer Grenzwert für Bestimmung der Partikelgrößenverteilung erreicht)

Die Mittelwerte der Partikelgrößen (D(0,5)) der kommerziellen Produkte erstreckten sich von 34 bis zu 190 µm. Die Partikelgrößen der auf den Pilotanlagen des Fraunhofer IVV hergestellten Muster waren deutlich kleiner mit D(0,5) zwischen 6 und 22 µm. Durch unterschiedliche Trocknungsverfahren, Agglomeration, Vermahlung oder Trockenmasseänderungen vor der Sprühtrocknung des feuchten Produktes kann die Partikelgröße durch die Hersteller angepasst werden. In Bezug auf die Dispergiertgeschwindigkeit ist die Partikelgröße ein mitbestimmender Faktor. Sie ist aber nicht allein für eine gute Löslichkeit der Proteinisolate verantwortlich.

Denaturierungsverhalten der Proteinisolate

Das Denaturierungsverhalten der Proteinisolate in 10 und 15%iger Lösung wurde mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) ermittelt. Auffällig war, dass sowohl die untersuchten Soja- als auch Erbsenproteinisolate keinen Denaturierungspeak aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass die Proteine bereits während der Gewinnungsverfahren denaturiert wurden.

Die untersuchten Rapsproteinisolate hingegen wiesen einen endothermen Peak zwischen 89 und 91 °C auf, so dass die Rapsproteine in den Isolaten größtenteils nativ vorliegen. Dies wird auch durch die hohe Löslichkeit bestätigt.

8 Gewinnung von Reinfractionen (AP 2)

Im Rahmen von Arbeitspaket 2 wurden an FS 2 Verfahren zur Gewinnung von hochreinen Proteinfractionen aus Erbse, Soja und Raps entwickelt. Ziel dabei war es, die Proteinfractionen Legumin und Vicillin (für Erbse), Glycinin und β -Conglycinin (für Soja) sowie Napin und Cruciferin (für Raps) möglichst hoch aufgereinigt für die Charakterisierung des intrinsischen Geschmacks durch die FS 1 zu gewinnen. Hierfür sollten Methoden aus der Literatur verwendet werden, die die Trennung dieser Fraktionen beschrieben, wobei auf den Einsatz von geschmacksaktiven Puffern (wie z.B. Urea) verzichtet werden sollte.

8.1 Fraktionierung von Erbsenproteinen

In Erbsensamen sind Albumine, Globuline und Gluteline enthalten, wobei der Anteil der Globuline mit 65 bis 85% an den Gesamtproteinen am höchsten ist [2]. Die Speicherproteine setzen sich vor allem aus dem 11 S-Protein Legumin (L), dem 7 S-Protein Vicilin (V) und dem Vicilin sehr ähnlichen 7 S-Protein Convicilin (CV), zusammen [2]. Dabei liegt das Mengen-Verhältnis von L zu V, abhängig vom jeweiligen Genotyp der Erbse bei 0,2 bis 1,5 [3, 4].

Legumin ist ein Hexamer mit einem Molekulargewicht von 320 - 380 kDa, das aus 6 Untereinheiten besteht. Jede dieser Untereinheiten ist aus einem sauren α -Polypeptid (~40 kDa) und einem basischen β -Polypeptid (~20 kDa) aufgebaut, die durch Disulfidbrücken aneinandergelagert sind. Vicillin ist ein trimeres Protein mit einem Molekulargewicht von ~170 kDa. Die Untereinheiten, aus denen Vicillin besteht, haben meist ein Molekulargewicht von ~50 kDa, ~47 kDa, ~34 kDa und ~30 kDa. Das dritte, weniger bedeutende Speicherprotein, Convicilin, besitzt bei einem gesamten Molekulargewicht von ca. 290 kDa drei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils ~71 kDa [4, 5].

Die Fraktionierung des Erbsenmehls in seine Proteinfractionen erfolgte zunächst über Extraktionsverfahren und anschließende fraktionierte Fällung von Legumin und Vicillin wie es in der Literatur beschrieben wurde.

8.1.1 Fraktionierungsverfahren nach Klassen [6]

Dabei wurden zunächst sogenannte „crude“ Proteinfractionen gewonnen, die in ihren Gehalten an Legumin und Vicillin angereichert sind. Die Produktströme sowie die TS- und Proteingehalte der verschiedenen Zwischenprodukte sind in Abbildung 8-1 A dargestellt. Der Legumin- und Vicillin-haltige Rückstand 2 wurde in Kaliumphosphat/NaCl-Puffer gelöst und gegen McIlvaines-Puffer bei pH 4,8 dialysiert.

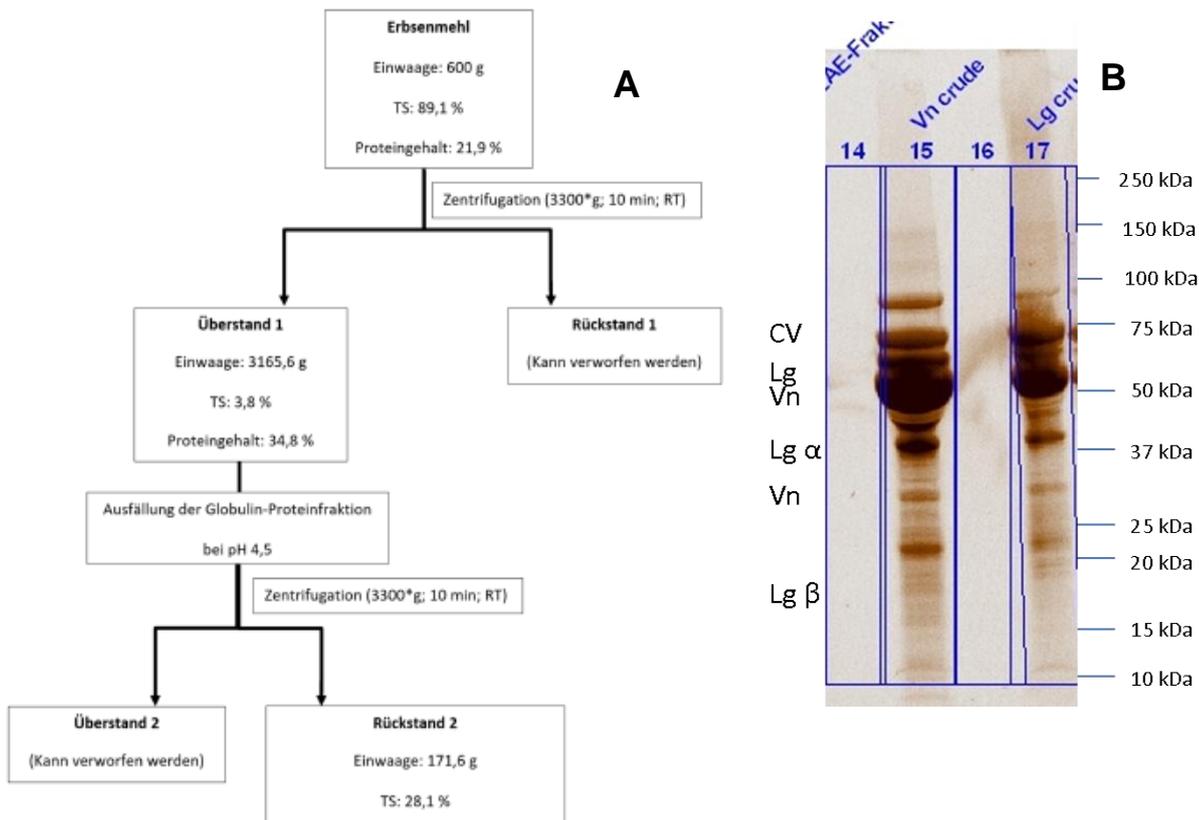


Abbildung 8-1: Produktströme und TS- sowie Proteingehalte der Zwischenprodukte (A) sowie SDS-PAGE der Legumin- und Vicillin-angereicherten Fraktionen (B)

Die Ausbeute der Legumin- und Vicillin-haltigen „crude“-Fraktionen war mit nur 9% bezogen auf den eingesetzten Rohstoff äußerst gering, was auf eine mangelhafte Löslichkeit des Erbsenproteins während der Extraktion von nur 36% bezogen auf die eingesetzte Proteinmasse zurückzuführen war. Dies wurde auf den einsetzenden Aussalzeffekt durch den eingesetzten $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaCl}$ -Puffer zurückgeführt. Ebenso konnte keine qualitative Auftrennung von Legumin und Vicillin erreicht werden, was an den identischen Banden in der SDS-PAGE zu sehen ist (Abbildung 8-1 B).

Da die Ausbeuten gering waren und das Verfahren sehr zeitaufwändig und materialintensiv war, wurde ein alternatives Extraktionsverfahren hinsichtlich seiner Anwendbarkeit zur Gewinnung von Legumin- und Vicillin-angereicherter Fraktionen untersucht. Hierbei wurde auf den Einsatz von Salzen verzichtet und die Extraktion im Alkalischen bei pH 8 durchgeführt.

8.1.2 Alternatives Extraktionsverfahren

Als alternatives Extraktionsverfahren wurde, wie bereits zuvor beschrieben, eine alkalische Extraktion des Erbsenmehls bei pH 8,0 durchgeführt. Durch diese einfache alkalische Extraktion konnten in diesem Schritt 78% der im Erbsenmehl vorhandenen Proteine suspendiert werden. Dies war im Vergleich zur eingesetzten Salzextraktion eine Verdoppelung des Anteils an extrahierten Erbsenproteinen. Nach erfolgter Extraktion wurden die Proteine bei einem pH-Wert von 4,5 isoelektrisch gefällt. Hierdurch konnte im Präzipitat ein Proteinanteil

von > 80% in der Trockensubstanz erzielt werden. Das Präzipitat bestand dabei vorwiegend aus den Globulinen Legumin, Vicillin und Convicillin.

Durch die weitere Aufreinigung der Globuline und die Gewinnung von Legumin- und Vicillinangereicherten Fraktionen durch fraktionierte Fällung wurden jedoch nur geringe Mengen an crude-Legumin (6,4 g) und crude-Vicillin (2,1 g) gewonnen. Diese zeigten jedoch auch keine ausreichende qualitative Trennung von Legumin und Vicillin.

Da diese relativ einfachen Extraktions- und Fällungsverfahren zu keinen erwünschten Anreicherungen von Legumin und Vicillin aus Erbsen führten, wurde im weiteren die Auftrennung von Erbsenproteinen mittels säulenchromatographischer Verfahren untersucht.

8.1.3 Gewinnung der Albuminfraktion aus Erbsen

Das Verfahren zur Gewinnung der Erbsenalbumine sowie die Massenströme sind in Abbildung 8-2 gezeigt. 80% der eingesetzten Proteinmasse konnte nach der Dialyse in der Globulin- und der Albuminfraktion wiedergefunden werden. Aus 100 g Erbsenmehl konnten mit der Albuminfraktion letztendlich 5,7 g Protein gewonnen werden, was bezogen auf den Proteingehalt im Erbsenmehl einer Ausbeute von etwa 29% entspricht.

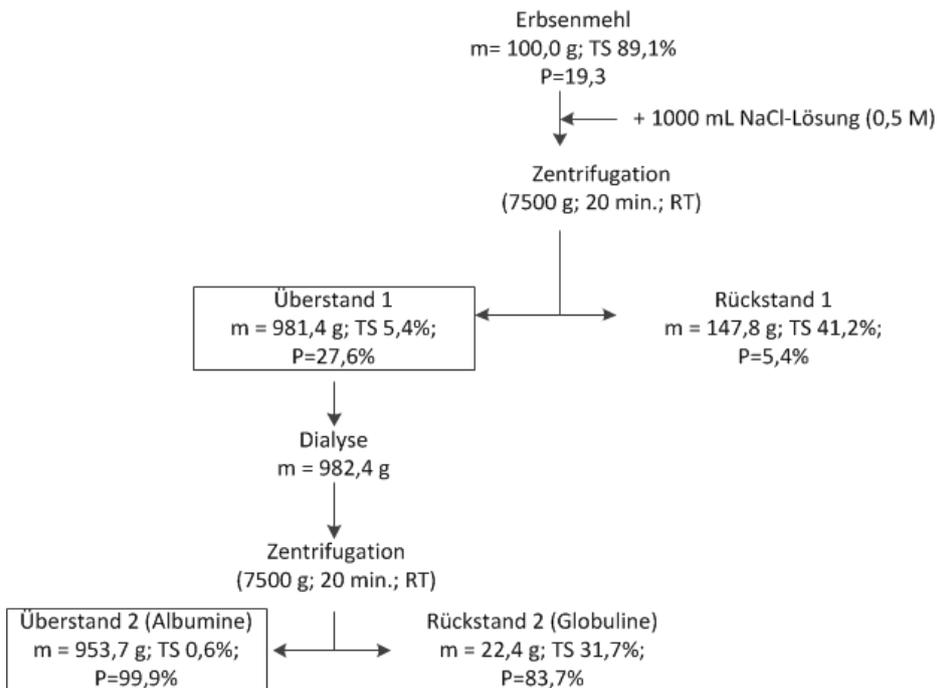


Abbildung 8-2: Verfahrensschema, Massenströme sowie TS- und Proteinausbeuten der Gewinnung von Erbsenalbuminen

Um den Erfolg der Trennung von Globulinen und Albuminen aus der Erbse mit Hilfe des Verfahrens von Tian, Kyle [7] zu bewerten, wurden die Proteinmuster mit Hilfe einer SDS-PAGE ermittelt und den in der Literatur bekannten Einzelproteinen zu geordnet (Abbildung 8-3).

Einige der Proteinbanden aus dem Extraktionsüberstand (1) waren nach der Dialyse und anschließender Zentrifugation nur in einer der beiden Fraktionen (2) oder (3) vorhanden, während sie in der anderen Fraktion nur schwach oder gar nicht erkennbar waren. Dies deutet zumindest auf eine Anreicherung von Albumin- und Globulinfraktionen durch das eingesetzte Verfahren hin. Die charakteristischen Banden der Lipoxygenase (LOX), der Erbsenalbumine PA2 und PA1 sowie eines weiteren Albumins (AL) sind nur in der Albuminfraktion (2) sichtbar. Die charakteristischen Banden von Legumin (L), Vicilin (V) und Convicilin (CV) finden sich allesamt in der Globulinfraktion (3). Der Vergleich von (3a) und (3b) zeigt deutlich, dass die Untereinheiten von Legumin (L) durch die Reduktion mit DTT in α -Polypeptide ($L\alpha$) und β -Polypeptide ($L\beta$) geteilt wurden. Zwei Proteinbanden zeigen sich außerdem in allen Proben mit gleichbleibender Intensität. Sie wurden mit einem Fragezeichen gekennzeichnet und konnten auf Basis von Literaturstellen nicht näher zugeordnet werden. Mit Hilfe der Software ImageLab 5.0 wurde ermittelt, dass die Intensität der charakteristischen Banden der Albumine einen Anteil von rund 62 und 76% (abhängig von der Zuordnung der beiden fraglichen Fraktionen) an der Gesamtintensität aller Banden in Fraktion (2) hatten.

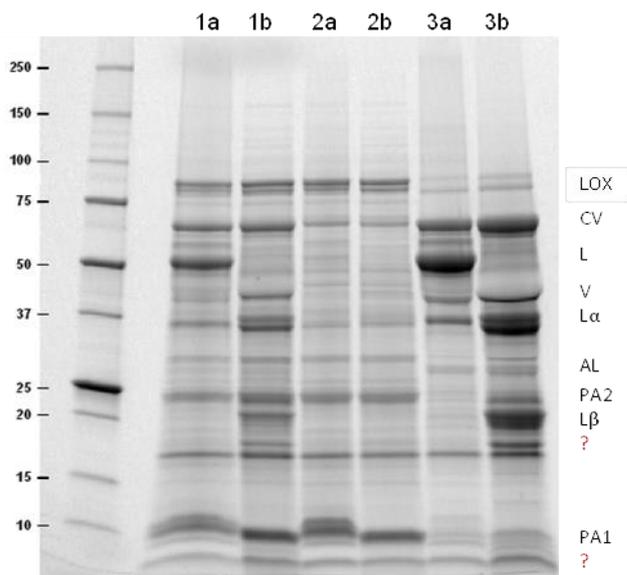


Abbildung 8-3: SDS-PAGE des Extraktionsüberstands (1), der Albumin- (2) und der Globulinfraktion (3) unter nicht-reduzierenden (a) und reduzierenden Bedingungen (b)

8.1.4 Fraktionierung von Erbsenproteinen mittels Säulenchromatographie

Weiterhin wurde die Aufreinigung von Legumin und Vicillin mittels verschiedener säulenchromatographischer Verfahren untersucht. Hierfür wurden in einem ersten Schritt der Einsatz verschiedener stationärer Phasen (Sephadex, Adsorber A 100 und DEAE-Sepharose) zur Trennung von Erbsenproteinfraktionen untersucht. Sephadex und der Adsorber A 100 zeigten keine Trennung der Erbsenproteinfraktionen, so dass die Ergebnisse hier nicht näher

erläutert werden. Die Trennung der Erbsenproteinfraktionen mit DEAE-Sepharose war in diesen Versuchen vielversprechend und wurde daher weiterverfolgt. Bei der Überprüfung der Auftrennung der Proteinfraktionen mittels SDS-PAGE konnte festgestellt werden, dass die Erbsenproteinfraktionen abhängig von der Konzentration des Elutionsmittels aufgetrennt werden konnten. Für die Elution der Proteine wurden NaCl-Lösungen mit einem stufenweisen Anstieg der NaCl-Konzentration von 0,05 M (ab F1) über 0,25 M (ab F11) bis hin zu 0,5 M (ab F21) verwendet. Die eluierten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf ihre qualitative Zusammensetzung untersucht. Auf Basis dieser Molekulargewichte wurden die Banden anschließend den Untereinheiten der Erbsenproteinfraktionen (CV (=Convicillin), V (=Vicillin), L (=Legumin), L α (=Legumin α) und L β (=Legumin β)) zugeordnet. Anhand der Veränderung dieses Musters über die Fraktionen hinweg ließ sich die Auftrennung der Proteine mittels Säulenchromatographie bestimmen.

Die Fraktionen Vicilin (V) und Convicillin (CV) wurden dabei mit dem ersten Puffer und einer NaCl-Konzentration von 0,05 M ab F1 eluiert. Die beiden Fraktionen wurden dabei stets gemeinsam eluiert, wobei sich die Intensität der Vicilin-Banden (V) bereits ab Fraktion 11 wieder verringerte, während die Intensität der Convicillin (CV)-Banden noch bis Fraktion 18 zunahm. Ab Fraktion 19 zeigte sich ein Übergangsbereich, in dem sowohl Untereinheiten von Vicilin (V) und Convicillin (CV) als auch Untereinheiten von Legumin (L) zu finden waren. Ab Fraktion 22 nahm die Intensität der Legumin (L)-Banden deutlich zu. Die Reinheit von Vicillin (V), Convicillin (CV) und Legumin (L) in den gesammelten Fraktionen ist in Tabelle 8-1 dargestellt.

Tabelle 8-1: Reinheit von Vicillin (V), Convicillin (CV) und Legumin (L) in den gesammelten Elutionsfraktionen (blau: V- und CV-angereicherte Fraktionen; grün: L-angereicherte Fraktionen)

	VL1	VL2	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13
CV	0	0	3	4	6	10	14	17	18	21	26	29	39	48	55
V	0	0	2	13	15	26	27	30	28	33	32	38	34	32	20
L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F15	F16	F16	F17	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28
CV	66	70	68	72	73	65	33	26	13	7	5	4	2	2	2
V	19	18	16	16	10	4	3	2	1	1	1	1	2	0	0
L	0	0	0	0	0	23	52	64	78	84	87	87	88	81	76

Für die Gewinnung der Reiffraktionen wurden aufgrund dieser Auswertung die Fraktionen F11 bis F17 als 7S-Fraktion (Vicilin und Convicillin) und die Fraktionen F22 bis F28 als 11S-Fraktion (Legumin) vereinigt und anschließend 2 Tage gegen dest. H₂O dialysiert, um das NaCl der Elutionslösungen aus den Proteinisolaten zu entfernen.

8.2 Fraktionierung von Sojaproteinen

Sojabohnen besitzen zwei Hauptspeicherproteine, das 7S Protein (β -Conglycinin) oder Vicilin-ähnliches Protein und das 11S Protein (Glycinin), das ähnlich dem Legumin aus Erbsen ist. Ungefähr 80 % des Proteins der Sojabohnen sind Speicherproteine, wovon ungefähr 37 % β -Conglycinin (7S), 31 % Glycinin (11S) und 11 % dimeres Glycinin (15S) sind (GARCÍA et al. 1997, LIU 1997). Die Speicherproteine der Leguminosen haben alle sehr ähnliche Molekülstrukturen, obwohl sie von unterschiedlichen Pflanzengattungen gebildet werden (LIU 1997). Sie werden anhand der Sedimentations-Geschwindigkeitskonstante in der Ultrazentrifuge mit der Svedbergeinheit (S) bezeichnet und so anhand ihres Sedimentationsverhaltens unterschieden (LIU 1997).

β -Conglycinin (7S-Protein) ist ein Trimer mit einem Molekulargewicht (M_r) von ungefähr 180 kDa und besteht aus α - (~57-63 kDa), α' - (~67-72 kDa) und β - (~42-47 kDa) Untereinheiten (AMNUAYCHEEWA & DE MEJIA 2010; THANH & SHIBASAKI 1976). Der isoelektrische Punkt (IEP) des Moleküls liegt bei pH 5,0. Glycinin (11S-Protein) ist ein Hexamer und hat ein Molekulargewicht von ungefähr 360 kDa. Die sechs inhomogenen Monomere (~60 kDa) bestehen aus Paaren unterschiedlicher basischer Polypeptide (~19-20 kDa) und saurer Polypeptide (~32-44 kDa), die mit Disulfidbrücken verbunden sind. Glycinin fällt unter Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen durch Bildung von Calciumbrückenbindungen leicht aus. Es entsteht ein sehr elastisches, poröses Gel (LIU 1997). Der isoelektrische Punkt (IEP) des Glycininmoleküls liegt bei pH 4,9. Das Molekül ist zudem knapp über dem Gefrierpunkt kältefallbar (DE SOUZA FERREIRA et al. 2010).

Für die Fraktionierung der 11 S und 7 S- Sojaproteine kamen nur Verfahren in Betracht, die die Proteine nicht denaturierten oder in ihre Untereinheiten aufspalteten, keine geschmacklichen Veränderungen durch Chemikalien und Puffer erzeugten sowie ausschließlich Chemikalien verwendeten, die lebensmittelrechtlich gemäß der Technische Hilfsstoff-Verordnung (THV) oder der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuIV) zugelassen waren. Aufgrund dieser vielen Kriterien schieden die meisten der gängigen Verfahren zur Gewinnung hochreiner Proteinisolate aus.

Für die fraktionierte Fällung der Sojaproteine wurde das in Abbildung 8-4 dargestellte Verfahren angewandt. Bei der ersten Extraktion bei pH 8,0 und RT = 21°C gingen 58% der Trockensubstanz und 54% der Proteine über den Rückstand verloren. Nach der Fällung der 11S-Fraktion bei pH 6,4 wurde der proteinhaltige Rückstand neutralisiert und dialysiert. Das Produkt enthielt daraufhin 12,9 g Protein, was einer Proteinausbeute von 13% entspricht. Über den Rückstand der zweiten Extraktion bei pH 5,0 und RT = 22°C wurden weitere 8% der Proteine abgetrennt. Nach der Fällung der 7S-Fraktion bei pH 4,8 wurde der proteinhaltige Rückstand gewaschen, neutralisiert und dialysiert. Das Produkt enthielt 6,5 g Protein, was einer Proteinausbeute von 6% entspricht. Durch die fraktionierte Fällung konnten nur sehr geringe Proteinausbeuten erzielt werden, allerdings hatten die Produkte dabei einen hohen Proteingehalt in der Trockenmasse.

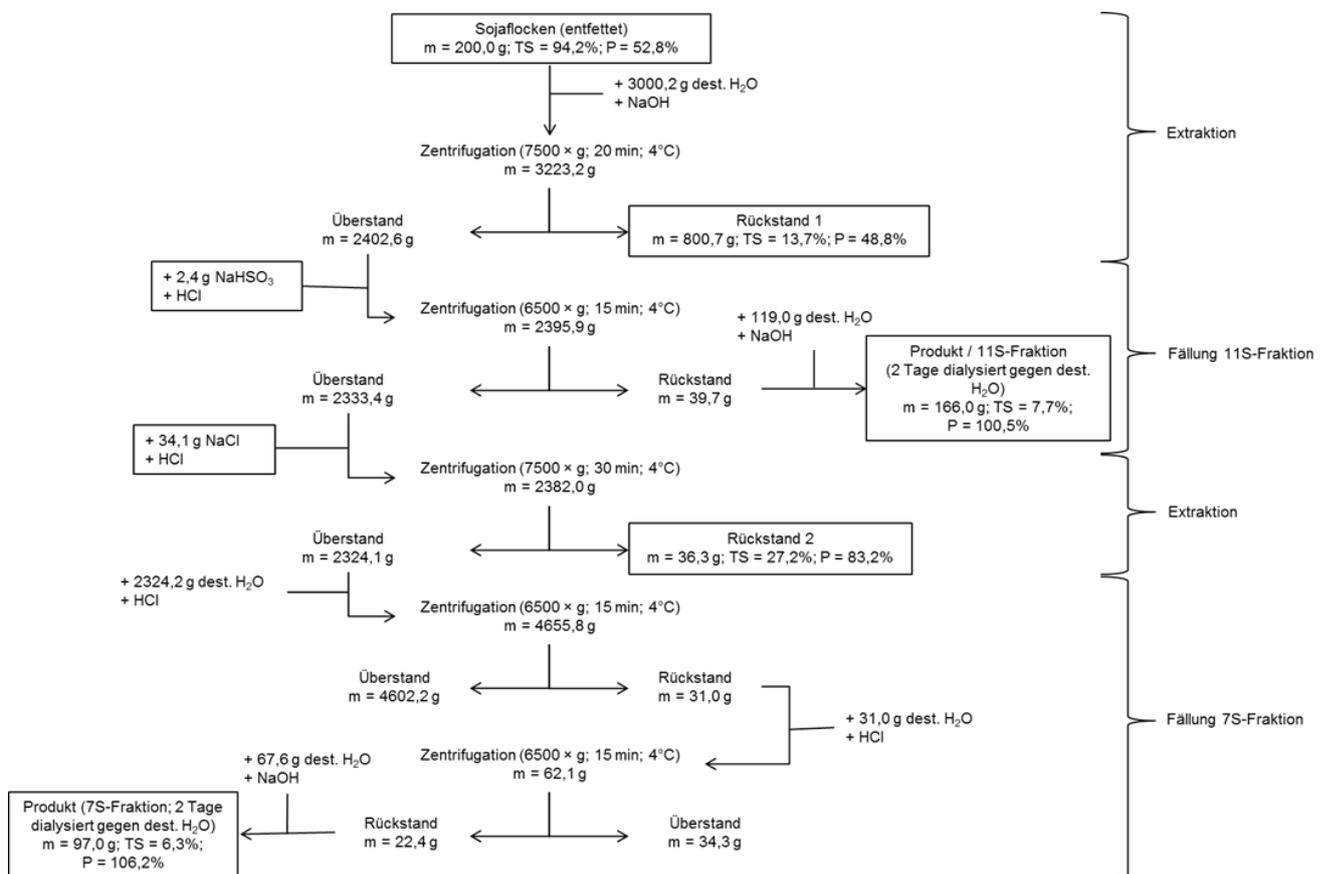


Abbildung 8-4: Verfahrensschema sowie Massenströme der Gewinnung von Sojaproteinfraktionen durch fraktionierte Fällung

Um zu überprüfen, ob durch das Verfahren eine Trennung der 7S- und 11S-Fractionen erreicht werden konnte, wurde die Zusammensetzung der Fractionen mittels SDS-PAGE untersucht (Abbildung 8-5).

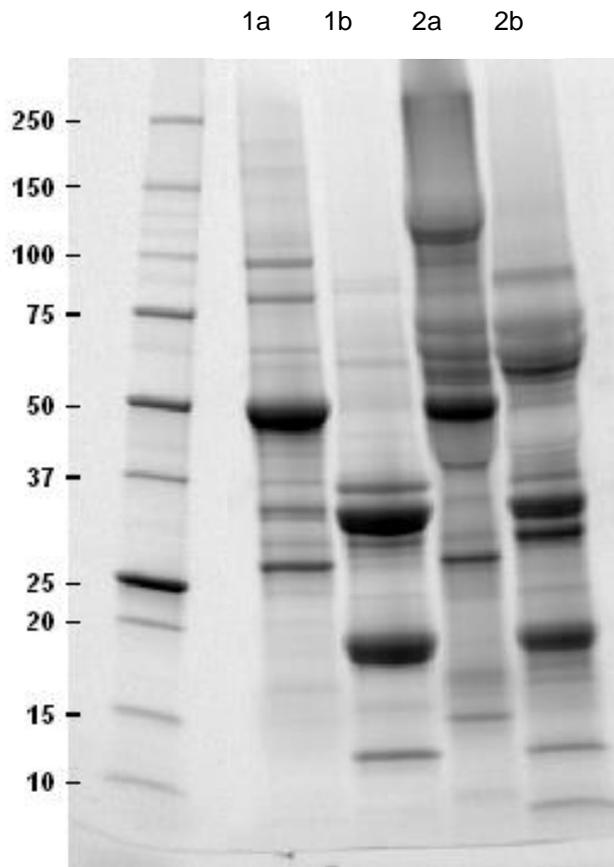


Abbildung 8-5: SDS-PAGE der 11S-Fraktion (1) und der 7S-Fraktion (2) aus der fraktionierten Fällung von Sojaproteinen unter nicht-reduzierenden (a) und reduzierenden (b) Bedingungen

Anhand des nahezu identischen Bandenmusters der beiden Fractionen lässt sich erkennen, dass keine ausreichende Auftrennung der 11 S- und 7S-Globuline der Sojabohnen stattgefunden hat. Mit dem beschriebenen Verfahren konnten daher keine Reinfractionen der Sojaproteine gewonnen werden.

Mit dem Verfahren nach De Souza Ferreira et al. (2010) konnte eine signifikante Anreicherung des Soja-Glycinins erreicht werden (Tabelle 8-2). Es konnte jedoch keine signifikante Anreicherung des β -Conglycinin (7S) mit den verwendeten Verfahren erreicht werden. Durch beide Verfahren ließ sich aus Sojaflocken ein Proteinisolat gewinnen, das sich durch seine sehr hohe Anreicherung des Glycinin gut als Basis für weitere Aufreinigerungsverfahren eignet. Durch das Verfahren von AOKI et al. (1980) wurde eine Anreicherung des Glycinin von 75,3 % (+ 8,3 %) und durch DE SOUZA FERREIRA et al. (2010) eine Anreicherung von 94,1 %. Mit nur 3% einer nieder-molekularen Proteinfraktion als zweiten Bestandteil ist das Isolat nach DE SOUZA FERREIRA et al. (2010) bereits fast rein. Eine Aufreinigung von β -Conglycinin war nicht zu realisieren.

Tabelle 8-2: Gehalt des β -Conglycinin und Glycinin in den Proteinisolaten

Extraktionsverfahren	Extraktionsrohstoff	Angestrebte Isolation	Proteingehalt β -Conglycinin (%)	Proteingehalt Glycinin (%)
AOKI et al. (1980)	Sojaflocken	β -Congly	7,2	70,6
	Sojaflocken	Gly	4,3	75,3 +8,3
DE SOUZA FERREIRA et al. (2010)	Sojaflocken	β -Congly	6,6	64,4
		Gly	0	94,1

8.3 Fraktionierung von Rapsproteinen

Raps (*Brassica napus* L.) ist eine Ölsaart und zählt zur Familie der Kreuzblütler [8]. Im Gegensatz zu den Leguminosen Erbse und Soja werden die Reservestoffe in Rapssamen mit einem Anteil von 48% vorwiegend als Fette gespeichert. Der Proteinanteil beträgt etwa 21% und rund 19% der Speichersubstanz ist Stärke [9]. Rapssamen enthalten vor allem zwei Klassen von Speicherproteinen: das 12 S-Globulin Cruciferin sowie das 2S-Albumin Napin. Wie auch bei den Leguminosen ist dabei der Anteil an Globulinen im Rapssamen höher als der Anteil an Albuminen. Cruciferin ist ein Hexamer mit einem Molekulargewicht von etwa 300 kDa und ähnelt in seiner Struktur dem Glycinin aus der Sojabohne. Die sechs Untereinheiten bestehen aus jeweils zwei Polypeptiden von etwa 30 kDa (α -Polypeptid) und 20 kDa (β -Polypeptid), welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Napin hat ein Molekulargewicht von etwa 12,5 kDa bis 14,5 kDa und besteht aus zwei Polypeptiden von etwa 4,5 kDa und 10 kDa, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die isoelektrischen Punkte von Napin und Cruciferin liegen bei pH 11,0 (Napin) und bei pH 7,2 (Cruciferin). Weiterhin enthalten Rapssamen einige kleinere Proteine wie Thionine, Trypsin-Inhibitoren und Lipidtransportproteine (LTP) [10]. Die Löslichkeit von Rapsproteinen ist in einem pH-Bereich von 4,0 – 5,0 minimal und nimmt in Richtung extremer pH-Werte sowohl im sauren als auch alkalischen Bereich gleichermaßen zu [11].

8.3.1 Gewinnung Cruziferin- und Napin-angereicherter Fraktionen mittels IVV-Verfahren

Die Herstellung von Cruziferin- und Napin-angereicherten Proteinfractionen lieferte grünlich bis bräunlich gefärbte Produkte, die eine pH-abhängige Farbänderung zeigten. Dies ist für Rapsproteinpräparate typisch. Weiterhin war auch der Proteinanteil der Cruziferin- und Napin-angereicherten Fraktionen mit 75,9% und 54,1% sehr gering. Dies bedeutet, dass der Anteil an Nebenbestandteilen hoch ist und bei der weiteren Aufreinigung dieser Fraktionen Wert auf die Abtrennung dieser Begleitstoffe gelegt werden muss. Die Ausbeuten der beiden Fraktionen betragen 13% für die Napin-angereicherte Fraktion und 9% für die Cruziferin-angereicherte

Fraktion. Um die qualitative Zusammensetzung der Cruziferin- und Napin-angereicherten Fraktion zu bestimmen, wurde die Molekulargewichtsverteilung der beiden Präparate mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen bestimmt (Abbildung 8-6). Die Napin-angereicherte Fraktion (Fraktion 1) weist dabei Molekulargewichte von 12,5 bis 14,5 kDa, mit Untereinheiten von 10 und 4,5 kDa. unterscheidet.

Abbildung 8-6: Molekulargewichtsverteilung (SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen) der Napin- (Fraktion 1) und der Cruziferin-angereicherten (Fraktion 2) Fraktion

Inwieweit noch die LTP (=Lipidtransportproteine) in der Napin-Fraktion vorliegen, kann nicht abschließend geklärt werden, da Napin und LTP ähnliche Molekulargewichte aufweisen. Fraktion 1 hat damit eine hohe Reinheit an Napin, allerdings ist der Proteingehalt dieser Fraktion mit etwa 50% deutlich geringer als die Anforderungen für die sensorische Bewertung der Reifractionen. Daher wurde der Fokus auf die Entfernung der weiteren Nebenbestandteile gelegt, um den Gesamtproteinanteil von Fraktion 1 zu erhöhen.

Die gewonnene höher molekulare Cruciferin-angereicherte Fraktion 2 zeigte die zu erwartenden Banden des Cruziferins bei 50 kDa, sowie dessen Untereinheiten von 20 und 30 kDa. Neben diesen charakteristischen Banden für Cruciferin waren allerdings auch Napin-Banden deutlich in der Fraktion 2 zu erkennen (Banden < 20 kDa). Daher wurde bei der Cruziferin-angereicherten Fraktion der Fokus auf die Abreicherung von Napin und weiterer Nebenbestandteile gelegt.

8.3.2 Abreicherung von Napin aus der Cruciferin-angereicherten Fraktion

Um die in der Cruciferin-angereicherten Fraktion enthaltenen niedermolekularen Proteinanteile abzureichern, wurde das gefriergetrocknete Pulver bei einem pH Wert von 7,7, der sich selbst einstellte, resuspendiert und eine zweite isoelektrische Fällung bei pH 4,5 durchgeführt. Die Trennung von Sediment und Überstand erfolgte bei 1000 g für 10 min. Der Überstand und das Sediment wurden ebenso auf die Molekulargewichtsverteilung mittels SDS-PAGE untersucht. Durch die 2. isoelektrische Fällung konnte der Proteinanteil der Cruziferin-angereicherten Fraktion lediglich von 85% auf 88% gesteigert werden. Es konnte allerdings nur eine geringe Abreicherung der Napin-Fraktion durch die wiederholte Fällung erreicht werden.

8.3.3 Aufreinigung des Cruciferins mittels säulenchromatographischer Verfahren

Während der Elution der Proteine über säulenchromatographische Auftrennung zeigte sich ein deutlicher Farbumschlag zwischen den Caps 5 und 6. Die braun bis oliv-grüne Färbung nahm deutlich ab und das Eluat war gelblich gefärbt (Tabelle 8-3). Die gelbliche Färbung des Eluats bestand bis zu einem Elutionsvolumen von über 100 ml, was auf anhaftende Nebenbestandteile hindeutet.

Tabelle 8-3: Eluat-Fractionen der Gelchromatographie der Cruziferin-angereicherten Fraktion mittels Sephaycryl 200 HR sowie die zugehörigen Lane-Nummern der SDS-PAGE

Cap Nummer		Volumen		Farbe	Lane Nummer
0	Vorlauf	10	ml		2
1		5	ml	braun	3
2		5	ml	braun	4
3		5	ml	braun	5
4		5	ml	braun	6
5		5	ml	heller geht in gelb über	7
6		5	ml	gelblich	8
7		5	ml	gelblich	9
8		5	ml	gelblich entfärbt weiter	10
9		5	ml	gelblich	11
10		5	ml	gelblich	12
11		5	ml	gelblich	13
12		5	ml	gelblich	14
13		5	ml	gelblich	15
14		5	ml	gelblich	16
15		5	ml	gelblich	17
16		5	ml	gelblich	
17		5	ml	gelblich	
18	Ende	5	ml	gelblich	
19	Nachlauf	5	ml	gelblich	
20		5	ml	gelblich	
21	Reinigung Mischprobe		ml	klar entfärbt	

Die Bestimmung der Proteinfraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen. Eine Trennung nach Molekülgröße über das verwendete Säulenmaterial war nur sehr begrenzt möglich, weil die Proteinfraktionen nur in den ersten 4 Caps (20 ml Eluat) beobachtet werden konnten. Die erhaltenen Proteinmuster der Caps 4 bis 7 zeigten dagegen keine scharfe Trennung in eine Cruziferin- oder eine Napin-Fraktion. Cap 4 enthält zwar einen höheren Anteil an Cruziferin, aber bereits ab Cap 5 zeigten sich schon intensive Banden des Napins. Dies bedeutet, dass durch die Gelchromatographie nur eine unscharfe Trennung von Cruciferin und Napin erreichbar war. Zudem war der Massenverlust sehr hoch. Weiterhin zeigte sich, dass eine Entfärbung erst nach erfolgter Elution der Proteine erkennbar ist. Dies deutet darauf hin, dass die in Rapssamen vorhandenen Farbstoffe an das Protein gebunden bzw. eingeschlossen sein könnten und durch die Gelchromatographie nicht abgetrennt werden konnten. Weitere Ansätze zur Trennung von Cruciferin und Napin wurden daher mit diesem Material nicht unternommen und es wurden das Extraktionsverfahren der Proteine angepasst (vgl. Kapitel 9.3.4).

8.3.4 Abreicherung von sekundären Pflanzenstoffen durch Adsorption

Auf Basis vorangegangener Projekte wurde weiterhin die Adsorption von Polyphenolen über organische Adsorber untersucht, um die Reinheit der Napin-angereicherten Fraktion, die

lediglich 50% Protein enthielt, zu erhöhen. Durch die Adsorption wurde der Proteingehalt der flüssigen Phase von ursprünglich 50,4 % auf 37,6% reduziert, was auf eine Bindung des Proteins an den Adsorber zurückzuführen ist. Auch eine nachgelagerte Waschung des Adsorbers zur Rückgewinnung des anhaftenden Proteins zeigte wenig Erfolg. Aus diesem Grund wurden diese Versuche nicht weiterverfolgt.

8.3.5 Aufreinigung der Napin-angereicherten Fraktion über DEAE-Sepharose

Nach Aufgabe der Napin-angereicherten Fraktion zeigte sich eine deutliche braune Farbfront auf der Säule, die ohne Zeitverzug die Fritte erreichte (Volumen ~ 20 ml = Probenvolumen). Eine Retention der Farbstoffe an der Säule erfolgte nicht. Durch die Erhöhung der Salzkonzentration im Eluenten wurde die Farbe wieder ausgetragen. Ein Maximum der Farbintensität trat bei Lane 6 und 7 auf. Beendet war der Farbaustrag bei Lane 8. In der Abbildung 8-7, SDS-Page ist der Bereich des Farbaustrages durch die braune Ellipse gekennzeichnet. Der Farbaustrag aus der Säule ist deckungsgleich mit den Proteinbanden. Eine Anreicherung des Proteinanteils war nicht möglich.

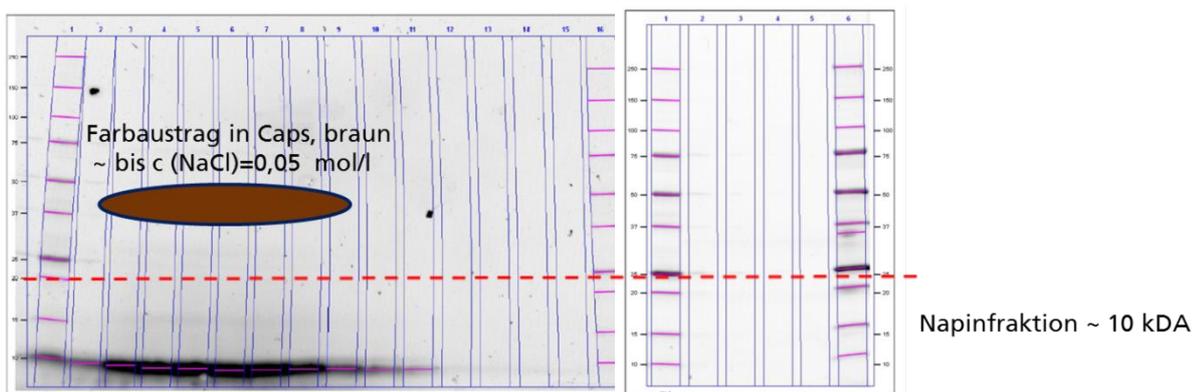


Abbildung 8-7: SDS-PAGE (unter reduzierenden Bedingungen) der Eluenten nach säulenchromatographischer Trennung mittels DEAE-Sepharose

Da sowohl zur Aufreinigung der Cruciferin- als auch der Napin-angereicherten Fraktion aus dem IVV-Verfahren scheiterten, wurde die Extraktion unter Zusatz eines Reduktionsmittels sowie NaCl- und Na-EDTA-Zusatz untersucht.

8.3.6 Extraktionsverfahren nach Bérot, Compoin [10]

Beim Verfahren nach Bérot, Compoin [10] sollte die Bindung der Rapsfarbstoffe durch die Zugabe von EDTA, NaHSO₃ und NaCl zum Extraktionsansatz verhindert werden. Um herauszufinden, welcher dieser Extraktionsmittel hierfür entscheidend ist, wurde die Extraktion mit drei unterschiedlichen Pufferzusammensetzungen durchgeführt. Der erste Ansatz (A1)

enthielt EDTA, NaHSO₃ und NaCl, der zweite Ansatz (A2) enthielt NaHSO₃ und NaCl und der dritte Ansatz (A3) enthielt nur NaHSO₃ als Zusatz.

Durch die zwei aufeinander folgenden Extraktionen gingen nur wenige Proteine über den Extraktionsrückstand verloren. Die Proteinausbeute der Produkte ist in allen drei Ansätzen sehr hoch. In A1 konnten 92%, in A2 90% und in A3 80% der Proteine aus dem Rohstoff gewonnen werden. Der Proteingehalt in der Trockenmasse ist im Produkt A3 mit 52,3% am höchsten, wobei die Reinheit der Proteinisolate nach der Extraktion insgesamt als gering einzustufen ist. Aufgrund des hohen Gehalts an Farbpigmenten, Polyphenolen und den eingesetzten Extraktionshilfsmitteln (NaHSO₃, NaCl und EDTA) war dies jedoch zu erwarten. Für die Abtrennung der Salze und anderer niedermolekularer Verbindungen (Farbpigmente und Polyphenole) aus den Proteinisolaten wurde im Anschluss eine Gelfiltrationschromatographie über Sephadex G-50 Fine durchgeführt. Da die Ergebnisse nach der Aufreinigung über die Säulenchromatographie für alle drei Versuchsansätze nahezu identisch waren, werden im Folgenden nur die Ergebnisse für den ersten Ansatz (A1) betrachtet. Schon anhand der unterschiedlichen Färbung der Fraktionen (Abbildung 8-8) lässt sich eine Auftrennung erkennen. Die ersten beiden Fraktionen sind klar und farblos. Mit F2 beginnt eine schwach gelbliche Färbung, die mit F3 an Intensität zunimmt und ab F4 wieder schwächer wird. Ab F6 beginnt eine grün-gelbliche Färbung, die bis F8 stärker wird und ab F9 wieder zurückgeht. Ab NL1 sind die Fraktionen wieder klar und farblos. Um herauszufinden, in welchen Fraktionen sich die Rapsproteine befinden, wurde eine SDS-PAGE mit den Fraktionen VL – NL3 durchgeführt (Abbildung 8-9).



Abbildung 8-8: Farbverlauf der Eluate nach der säulenchromatographischen Entsalzung mittels Sephadex G-50 fine im Vergleich zum eingesetzten Filtrat

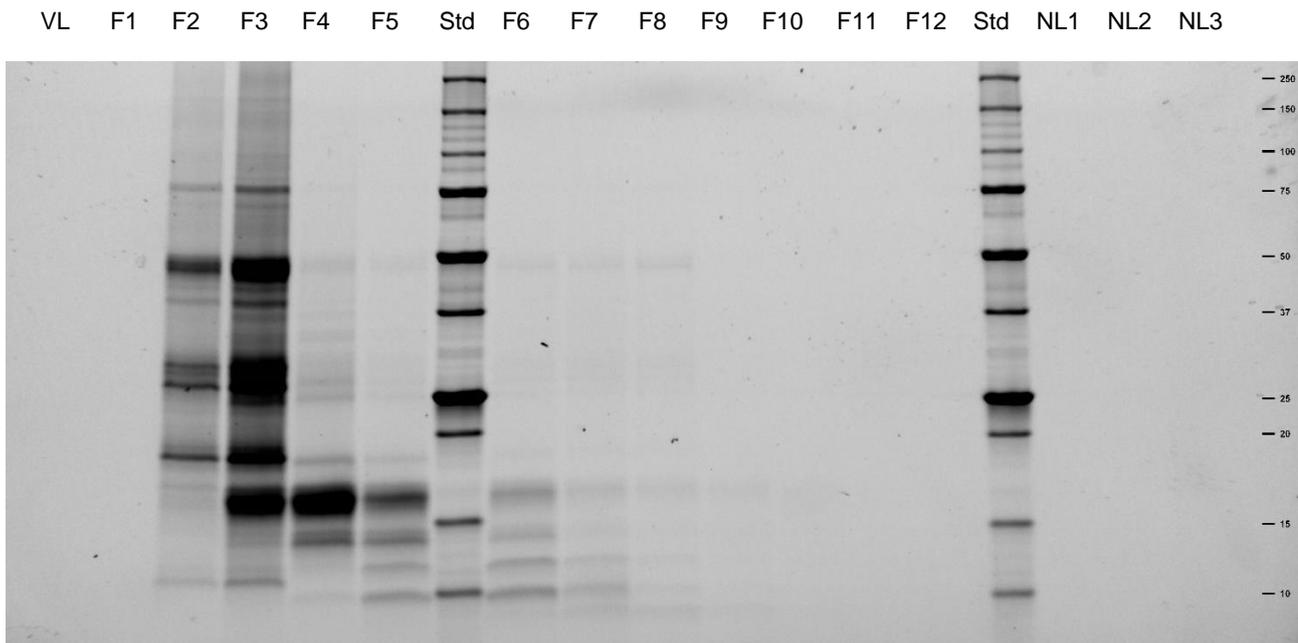


Abbildung 8-9: SDS-PAGE der Eluate der säulenchromatographische Abreicherung der Rapsfarbstoffe mittels Sephadex G-50 fine mit dem Proteinextrakt aus A 1

Wie in Abbildung 8-9 zu erkennen ist, befinden sich die Rapsproteine vor allem in den Fraktionen F2 bis F6. Die größeren Untereinheiten in F2 und F3 mit Proteinbanden bei ungefähr 50 kDa, 30 kDa und 20 kDa sind dabei dem Cruciferin zuzuordnen. Die Banden von 15 kDa und weniger in F3 bis F5 gehören zu den Untereinheiten des Napins. Dies bedeutet, dass die grün-gelbliche Farbfraction ab F6 getrennt von den Proteinen eluiert wurde und somit einige Farbstoffe von den Rapsproteinen abgetrennt werden konnten. Da dieses Ergebnis bei allen Versuchsansätzen erzielt werden konnte, scheint vor allem der Zusatz von NaHSO_3 die Bindung der Farbpigmente an die Rapsproteine zu verhindern. Insgesamt waren die Untersuchungen zur Trennung von Napin und Cruciferin im Rahmen des Projektes nicht erfolgreich und wurden in Abstimmung mit dem PA nicht weitergeführt. Aus diesem Grund sowie aufgrund der Anzahl an bislang unbekanntem Substanzen, die für den bitter-adstringierenden Fehlgeschmack verantwortlich sind, wurden die weiteren Untersuchungen auf Erbse fokussiert.

9 Optimierung von Verfahren zur Gewinnung sensorisch optimierter Proteinisolate am Beispiel Erbse (AP 6)

Im Rahmen von Arbeitspaket 6 wurden an FS 2 Verfahren zur Gewinnung von sensorisch verbesserten Proteinisolaten aus Erbse optimiert. Ziel dabei war es, anhaftende Begleitstoffe, die für den bitter-adstringierenden Fehlgeschmack von Erbsenproteinisolaten ursächlich sind, weitestgehend zu minimieren. Hierfür wurden die folgenden Verfahrensansätze untersucht:

- Lösemittelbehandlung der Erbsenmehle mit Hexan, Ethnaol, Hexan/Ethanol, CO₂ bei 285 bar, CO₂ bei 750 bar, CO₂ bei 285 bar + Ethanol, CO₂ bei 750 bar + Ethanol
- Hydrothermische Vorbehandlung des Rohstoffs
- Einsatz einer oder mehrerer Vorextraktionen bei pH 4,5
- Variation der Extraktionsbedingungen (pH, Temperatur, s:l)
- Variation der Isolierungsverfahren (isoelektrische Fällung (pH, Temperatur), Ultrafiltration (pH, Temperatur), Ultrafiltration/Diafiltration, Ultrafiltration/thermische Fällung)

Für die Optimierung wurden sowohl die Ausbeute, der Proteingehalt der Isolate als auch die funktionellen und sensorischen Eigenschaften bewertet.

9.1 Einfluss der Vorbehandlung mit Lösemitteln

Um den Einfluss einer Vorbehandlung des Rohstoffs mit Lösemitteln zu untersuchen, wurden folgende Lösemittel bzw. Lösemittelgemische untersucht:

- Hexan
- Ethanol
- Hexan/Ethanol
- CO₂-Extraktion bei 285 bar, 50 °C;
- CO₂-Extraktion bei 285 bar, 50 °C mit 5 % Ethanol als Schleppmittel und
- CO₂-Extraktion bei 285 bar, 50 °C und 10% Ethanol als Schleppmittel
-

Zusammensetzung der behandelten und unbehandelten Erbsenmehle

In Tabelle 9-1 sind die TS- und Proteingehalte des unbehandelten Erbsenmehls (vollfett) im Vergleich zu den mit Lösemitteln und überkritischem CO₂ behandelten Mehlen dargestellt.

Tabelle 9-1: Trockensubstanz- und Proteingehalt des unbehandelten Erbsenmehls im Vergleich zu den mit Lösemitteln und überkritischem CO₂ behandelten Erbsenmehlen

Mehl	TS[%]	Protein i.d TS [%]
Vollfett	89,1±0,1	19,5±0,1
n-Hexan	90,7±0	21,9±0,1
Ethanol absolut	91,0±0	22,4±0,2
Gemisch aus (Hexan_Ethanol_Wasser)	91,0±0,4	23,6±1,3
CO ₂ _285 bar_50°C	94,9±0,3	21,7±0,2
CO ₂ _285 bar_50°C_Ethanol	94,9 ±0,2	22,3±0,1
CO ₂ _750 bar_50°C	94,5 ±0	22,3±0,1
CO ₂ _750 bar_50°C_Ethanol	94,6 ±0	22,2±0,3

Die Zusammensetzung des Erbsenmehls nach der Behandlung mit den unterschiedlichen Lösemitteln und mit überkritischem CO₂ unterscheidet sich erwartungsgemäß vom unbehandelten Mehl und in Abhängigkeit des verwendeten Lösemittels. Die mit überkritischem CO₂ behandelten Erbsenmehle besitzen einen höheren TS-Gehalt als die mit Lösemittel-behandelten Mehle (90,7% und 91,0 %) und das unbehandelte Mehl mit 89,1 %. Der höchste Proteingehalt nach einer Behandlung wurde mit dem azeotropen Gemisch aus Hexan, Ethanol und Wasser erzielt (23,6 %). Die Restfettgehalte der behandelten Erbsenmehle wurden nicht bestimmt, sollten aber aufgrund der extrahierten Ölmengen Werte von ≤1% erreichen. Restfettgehalte von <1% sind gewünscht, um lagerstabile Produkte zu erhalten.

Einfluss der Lösemittelbehandlung auf die Proteingewinnung

Die Proteinisolate wurden aus dem vollfetten und dem entölten Mehl mittels alkalischer Extraktion und isoelektrischer Fällung gewonnen. Anschließend wurde der neutralisierte Proteinquark sprühgetrocknet und analytisch charakterisiert (Tabelle 9-2).

Der TS-Gehalt aller Isolate lag mit mind. $93,4 \pm 3,9\%$ über den Bedingungen für eine gute Lagerstabilität der Isolate. Hierfür sollte der Trockensubstanzgehalt mind. 90% betragen, was mit einem Restwassergehalt von 10% korreliert. Die Isolate, die aus vollfettetem, n-Hexan-behandeltem Mehl sowie aus den CO₂-behandelten Proben mit 750 bar, 50 °C mit und ohne Zusatz von Ethanol behandelt wurden, wiesen einen Proteingehalt zwischen $83,2 \pm 1,2 \%$ und $85,7 \pm 0,2\%$ auf. Diese Isolate hatten somit allesamt einen Proteingehalt von < 90%, was bei dem verwendeten Verfahren für Erbsenproteinisolate typisch ist und mit den Proteingehalten kommerzieller Erbsenproteinisolate (z.B. Pisane M9) vergleichbar ist. Die relativ niedrigen Proteingehalte dieser Erbsenproteinisolate könnten auf einen vergleichsweise höheren

Fettgehalt hindeuten. Insbesondere bei unbehandeltem, vollfetterm Erbsenmehl ist der Fettgehalt mit bis zu 10% recht hoch. Trotz der Behandlung mit n-Hexan und überkritischem CO₂ bei 750 bar scheint auch hier ein nach wie vor signifikanter Anteil an Fett bzw. Fettbegleitstoffen in den Isolaten vorhanden zu sein. Die Isolate aus Ethanol- und mit einem Gemisch aus Hexan-Ethanol und Wasser behandelt wurden, wiesen signifikant höhere Proteingehalte mit Werten 95,9±3,6 % und 92,5±2,7 % auf. Dies deutet auf eine bessere Extraktion von Fett und Fettgleitstoffen durch polarere Lösemittel hin.

Probe	TS (%)	Protein (%) in TS
Vollfett	95,1±0	83,7±1
n-Hexan	93,4±3,9	83,2±1,2
Ethanol absolut	94,5±3,2	95,9±3,6
Gemisch aus (Hexan_Ethanol_Wasser)	94,2±2,3	92,5±2,7
CO2_285 bar_50°C	95,7±2,1	90,1±3,5
CO2_285 bar_50°C_Ethanol	94,9±1,9	92,0±4,5
CO2_750 bar_50°C	98,4±0,2	85,6±0,4
CO2_750 bar_50°C_Ethanol	97,3±0,7	85,7±0,2

Tabelle 9-2: Zusammensetzung der Proteinisolate

Die Ausbeuten (Trockensubstanzausbeute (TSA), Proteingesamtausbeute (PGA), Extraktionsausbeute (EA) und Fällungsausbeute (FA)) sind in Abbildung 9-1 und Abbildung 9-2 dargestellt.

Die Extraktionsausbeute war beim vollfetterm Erbsenmehl am höchsten gefolgt von Hexan-entöltem Erbsenmehl. Wie zu erwarten, beeinträchtigte die Verwendung von Ethanol die Proteinlöslichkeit im Extraktionsmedium. Im Vergleich dazu wiesen alle mit überkritischem CO₂-behandelten Erbsenmehle hohe PGA von 50 bis 64% auf. Die Verwendung von Ethanol spielte dabei nur eine untergeordnete Rolle.

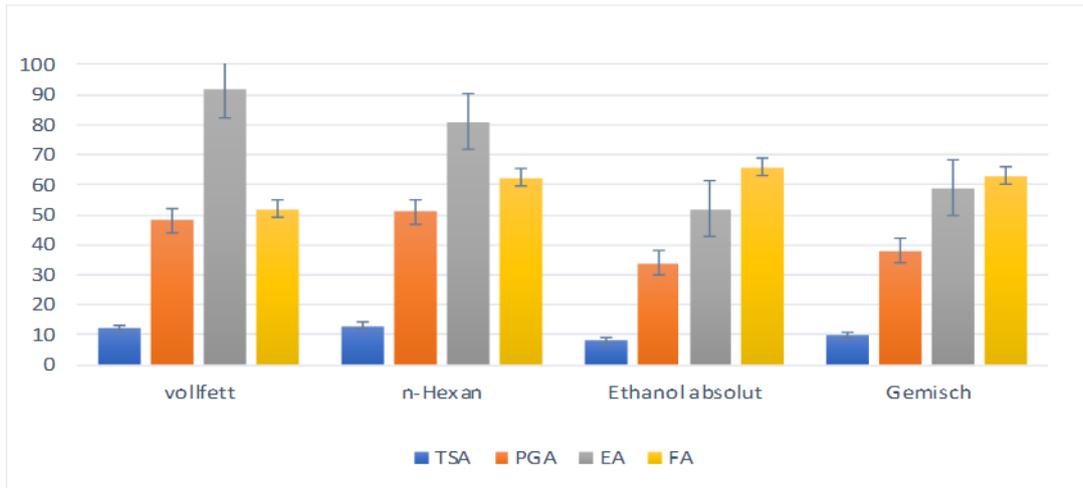


Abbildung 9-1: Ausbeuten der Erbsenproteine in Abhängigkeit der Lösemittelvorbehandlung

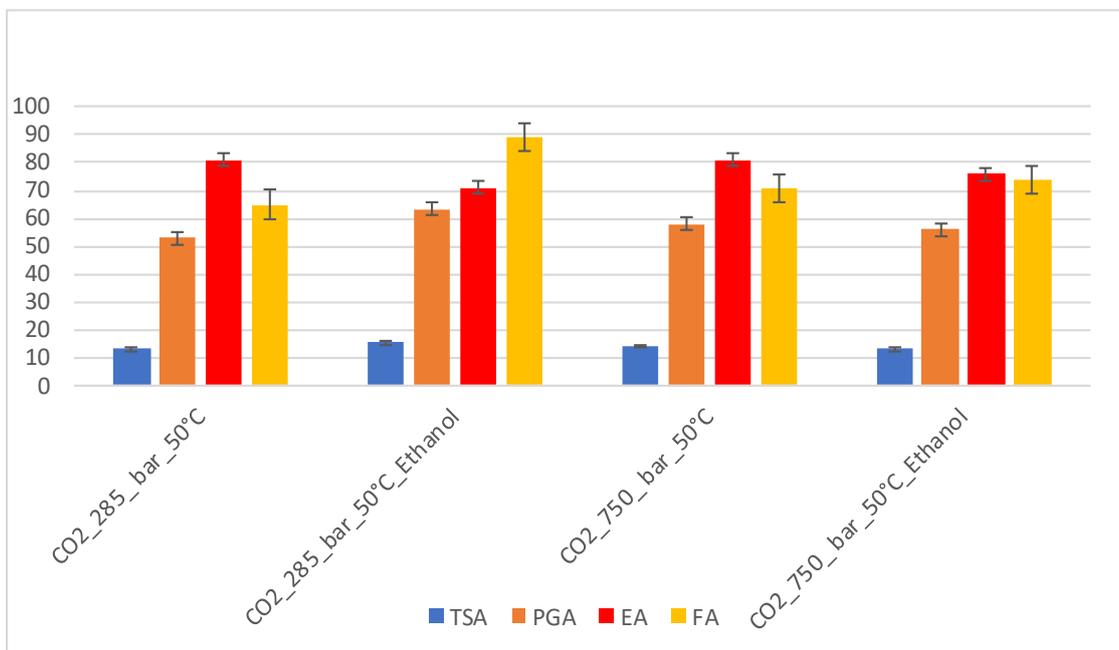


Abbildung 9-2: Ausbeute der Erbsenproteinisolate nach Vorbehandlung mit überkritischem CO₂

Einfluss der Lösemittelbehandlung auf die thermischen Eigenschaften der Erbsenproteinisolate

Während der Extraktion und Fällung kann es zu Strukturänderungen der Proteine kommen. Um diese zu ermitteln, wurden die Denaturierungstemperatur und die Enthalpie der Denaturierung mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) bestimmt. Die DSC-Messungen geben Auskunft über Proteinveränderungen. Die Enthalpie ΔH ist ein Indikator für den Gehalt nicht denaturierter Proteine, wobei niedrige ΔH Werte auf eine Denaturierung der Proteine hinweisen.

Tabelle 9-3 zeigt die Denaturierungsenthalpien, die Anfangstemperaturen der Denaturierungspeaks und die Peak-Temperaturen (mittlere Denaturierungstemperatur). Alle

Erbseproteinisolate hatten nur einen Denaturierungspeak bei Temperaturen zwischen 74 und 81 °C. Die Denaturierungstemperaturen und –enthalpien der Isolate lagen alle in einem ähnlichen Bereich, so dass keine Einflüsse auf das thermische Verhalten erkennbar waren.

Tabelle 9-3: Übersicht über die Enthalpie ΔH , die Anfangstemperatur T_{\min} des Denaturierungspeaks und die mittlere Denaturierungstemperatur (T_{Peak})

Probe	ΔH [J/g]	T_{\min} [°C]	T_{Peak} [°C]
Vollfett	0,9±0,1	78,3±0,1	85,0±1,2
n-Hexan	0,4±0,3	80,9±3,2	86,5±1,4
Ethanol absolut	1,3±0,1	76,8±0,0	84,1±1,1
Gemisch aus (Hexan_Ethanol_Wasser)	1,7±0,2	74,1±0,3	82,9±1,0
CO2 285_50°C	0,9±0,1	77,7±0,9	83,3±0,4
CO2 285_50°C_Ethanol	1,0±0,1	77,5±0,5	83,1±0,7
CO2 750_50°C	0,9±0,1	77,3±0,7	83,6±0,8
CO2 750_50°C_Ethanol	0,8±0,1	78,6±0,0	84,1±0,6

Farbe der Isolate

Tabelle 9-4 stellt die L^* a^* b^* Werte von allen Proteinisolaten, die C^* und h^* Werte sowie den Farbunterschied ΔE_{a^*b} im Vergleich zum Proteinisolat aus vollfetterm Erbsenmehl als Referenz dar. Das vollfette Proteinisolat wies eine intensive Gelbfarbe mit einem von $b^*=21,3$ auf, die durch die Anwesenheit von Carotinoiden oder Tocopherolen entstehen könnte. Am wenigsten gelblich und am hellsten war das Erbsenproteinisolat aus dem mit CO₂ bei 750 bar behandeltem Erbsenmehl ($b^*=8,2$, $L^*=94,5$).

Allgemein waren die Proteinisolate aus den Mehlen, die mit überkritischem CO₂ behandelt wurden, etwas heller als die Proteinisolate aus Mehlen, die mit den organischen Lösungsmitteln behandelt wurden. Der Unterschied ist allerdings recht gering, sodass er mit bloßem Auge nicht wahrnehmbar ist.

Tabelle 9-4: Farbwerte der Erbsenproteinisolate

Name der Probe	L^*	a^*	b^*	ΔE_{a^*b}
Vollfett	91,0	0,9	21,3	
n-Hexan	92,9	0,9	9,8	11,7
Ethanol absolut	94,3	0,8	9,6	12,1

Gemisch aus (Hexan_Ethanol_Wasser)	94,4	0,1	9,7	12,1
CO2 285_50°C	93,9	0,3	9,6	13,1
CO2 285_50°C_Ethanol	93,9	0,5	8,5	13,5
CO2 750_50°C	94,5	0,5	8,1	13,7
CO2 750_50°C_Ethanol	94,4	0,3	8,3	13,5

Alle hergestellten Erbsenproteinisolate besaßen einen L*-Wert über 90, was auf eine hohe Helligkeit der Proben hindeutet. In Tabelle 9-4 sind auch die ΔE_{a*b} Werte abgebildet. Das Isolat n-Hexan hat einen Wert von 11,7. Es gab einen sehr geringen Farbunterschied von 0,4 zwischen den Isolaten n-Hexan, Ethanol absolut und dem Isolat, das mit dem Gemisch aus Hexan_Ethanol_Wasser hergestellt. Die Isolate aus der Behandlung mit CO₂ unterscheiden sich untereinander auch nur wenig.

Da die sensorische Bewertung ergeben hat, dass sich die Bitterkeit durch eine Lösemittelvorbehandlung sogar verstärkte, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.

9.2 Einfluss von Vorextraktionen

Weiterhin wurde der Einfluss einer oder mehrerer Vorextraktionen auf die Proteinausbeute aus vollfetterm Erbsenmehl untersucht. Dabei zeigte sich, dass durch den Einsatz von einer Vorextraktion mit einem s:l-Verhältnis von 1:10 die Proteingesamtausbeute (PGA) um 15% sank, bei einer Vorextraktion mit dem s:l-Verhältnis von 1:15 verringerte sich die PGA um fast 40% und beim Einsatz von 2 Vorextraktionen reduzierte sich die PGA von 76% auf 30% (Abbildung 9-3). Aufgrund dieser drastischen Ausbeuteeinbußen ist der Einsatz von Vorextraktionen nicht empfehlenswert und wurde daher nicht weiterverfolgt.

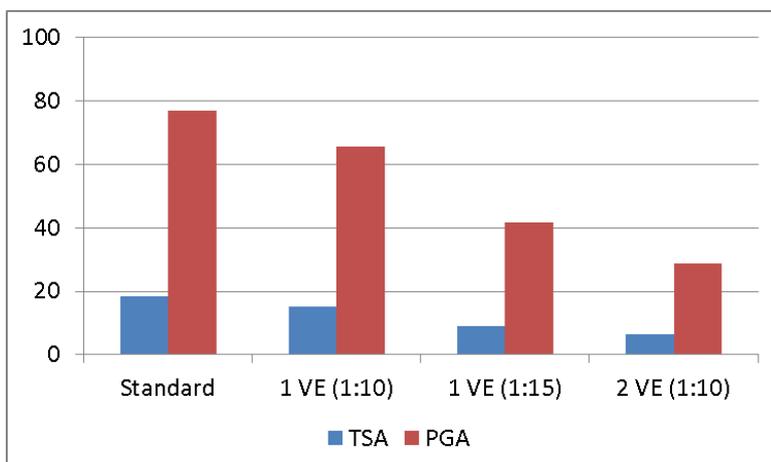


Abbildung 9-3: PGA und TSA in Abhängigkeit der Anzahl der Vorextraktionen und des s:l-Verhältnisses

9.3 Einfluss der Extraktionsbedingungen

Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener Extraktionsbedingungen auf die Ausbeute, die funktionellen Eigenschaften und das Denaturierungsverhalten untersucht. Dabei wurden das s:l-Verhältnis, der pH-Wert, die Partikelgröße des Mehls und die Extraktionstemperatur variiert. Ausgewählte Isolatproben wurden zudem an FS 1 sensorisch bewertet.

Variation des s:l-Verhältnisses

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die Extraktausbeute mit zunehmendem s:l-Verhältnis steigt. Die PGA und die TSA waren jedoch maximal bei einem s:l-Verhältnis von 1:10 (Abbildung 9-4). Daher wurden die weiteren Untersuchungen mit einem s:l-Verhältnis von 1:10 durchgeführt.

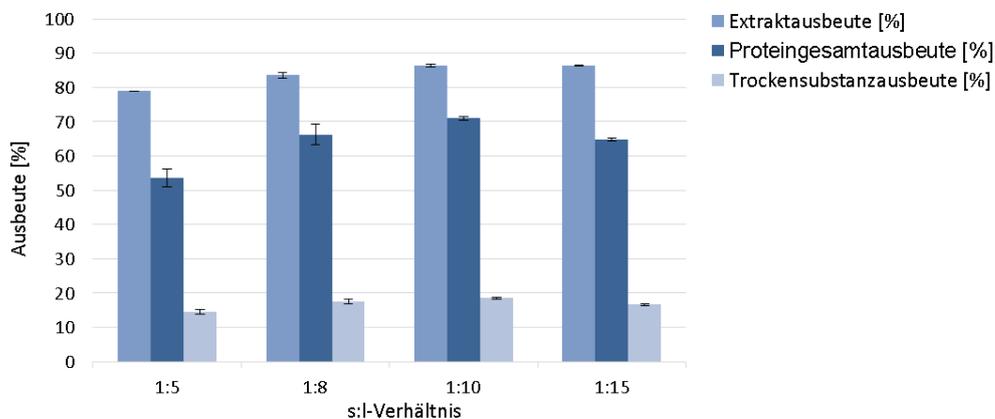


Abbildung 9-4: TSA, PGA und EA in Abhängigkeit des s:l-Verhältnisses

Die Proteinlöslichkeiten der Isolate variierte im Bereich zwischen 67,3 und 70,2%. Lediglich bei einem s:l-Verhältnis von 1:15 lag die Löslichkeit mit 62,6% darunter, was auf die Anwesenheit von unterschiedlichen Proteinfractionen in den Isolaten hindeuten könnte. Unterschiede beim Denaturierungsverhalten konnten jedoch nicht nachgewiesen werden.

Einfluss des Extraktions-pH-Werts

Weiterhin wurde der Einfluss des Extraktions-pH-Werts auf die Ausbeute und die Proteineigenschaften untersucht. Dabei zeigte sich, dass mit steigendem Extraktions-pH-Wert die EA, die TSA und die PGA deutlich anstiegen und ab pH 8,0 ein Plateau erreicht wurde (Abbildung 9-5). Eine weitere Steigerung des pH-Wertes führte zu keiner weiteren Steigerung der Ausbeute.

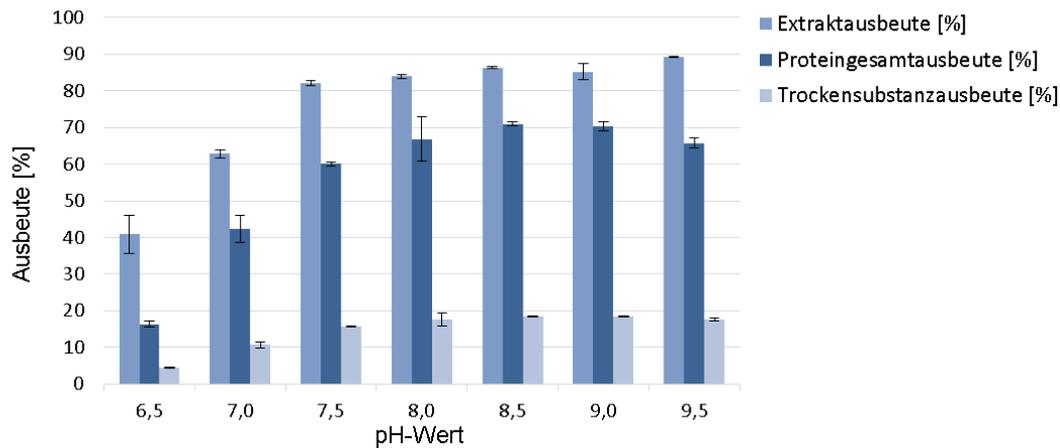


Abbildung 9-5: Einfluss des Extraktions-pH-Werts auf die EA, die PGA und die TSA

Die Proteinlöslichkeit der Isolate zeigte einen gegenläufigen Trend. Mit steigendem Extraktions-pH-Wert nahm die Proteinlöslichkeit ab. So hatten die bei pH 7,0 extrahierten Proteine eine Löslichkeit von 74%, während die Löslichkeit für die Isolate, die bei pH 9,5 extrahiert wurden, auf 65,5% sank.

Auch diese Isolate zeigten ein vergleichbares Denaturierungsverhalten. Die einzige Ausnahme war das Isolat, das bei pH 6,5 extrahiert wurde. Dieses hatte im Vergleich zu den anderen Präparaten eine geringere Enthalpiedifferenz, was auf die Abwesenheit einzelner Proteinfractionen hindeuten könnte.

Einfluss der Extraktions-Temperatur

Die Extraktionstemperatur beeinflusste die PGA, TSA und EA nicht. Ebenso konnte kein Einfluss auf die Proteinlöslichkeit und das Denaturierungsverhalten festgestellt werden. Einzige Ausnahme waren die Isolate, die bei 50 °C extrahiert wurden. Diese wiesen eine signifikant schlechtere Löslichkeit (55%) auf und hatten eine geringere Enthalpiedifferenz, was auf eine beginnende Proteindenaturierung hinweist.

Einfluss der Korngrößenverteilung

Die Korngrößenverteilung des Erbsenmehls hatte einen Einfluss auf die Proteinausbeute. Für diese Untersuchungen wurden Siebfraktionen des Erbsenmehls bei 125 µm, 250 µm, 500 µm und 750 µm hergestellt und die TSA und PGA verglichen. So zeigte sich, dass die Ausbeute um 6% höher war, wenn ein Mehl verwendet wurde, das mit einem 500 µm Siebeinsatz im Vergleich zu einem Mehl, das mit einem 750 µm Siebeinsatz vermahlen wurde. Kleinere Partikelgrößen erhöhten die TSA und PGA jedoch nicht weiter.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Extraktion der Erbsenproteine idealerweise bei einem pH-Wert zwischen 7,5 und 8,5 und einem s:l-Verhältnis von 1:10 erfolgen sollte. Die Extraktionstemperatur wurde aufgrund Energieeinsparungen bei Raumtemperatur durchgeführt, da diese hohe Ausbeuten lieferte. Für die Untersuchung des Einflusses der

Fällungsbedingungen wurde daher die Extraktion bei pH 8,5, Raumtemperatur und einem s:l-Verhältnis von 1:10 durchgeführt.

9.4 Einfluss der Isolierungsbedingungen

Isoelektrische Fällung – Einfluss des Fällungs-pH-Werts

In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss des Fällungs-pH-Werts auf die Ausbeute und die Proteineigenschaften untersucht. Dabei zeigte sich, dass die FA, die PGA und die TSA bei pH 4,5 und pH 5,0 am höchsten waren. Bei pH-Werten < 4,5 verringerten sich die Ausbeuten drastisch (Abbildung 9-6). Bei pH 3,5 sank zudem der Proteingehalt des „Isolats“ auf 67%, was auf die Co-Präzipitation weiterer Stoffe hindeutet.

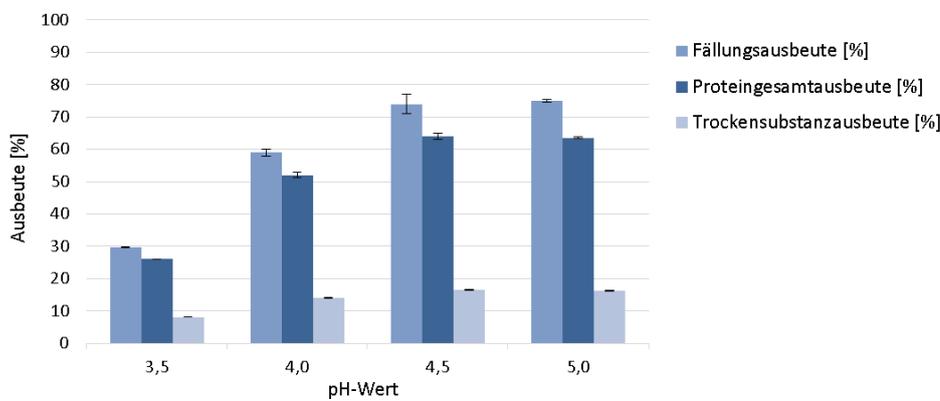


Abbildung 9-6: Einfluss des Fällungs-pH-Werts auf die FA, die PGA und die TSA

Die Proteinlöslichkeiten waren bei allen pH-Werten um die 70% und auch das Denaturierungsverhalten der Isolate war bis auf das bei pH 3,5 gefällte Präparat vergleichbar.

Isoelektrische Fällung – Einfluss der Fällungstemperatur

Ebenso wie bei der Extraktion, hatte die Temperatur auch bei der Fällung keinen Einfluss auf die Ausbeute und die Proteineigenschaften. Aus diesem Grund wurde die Fällung immer bei Raumtemperatur durchgeführt, um sich Kühl- oder Heizenergie zu sparen. Auf Basis dieser Erkenntnisse wird eine isoelektrische Fällung der Erbsenproteine bei einem pH-Wert von 4,5 bis 5,0 bei Raumtemperatur empfohlen.

Ultrafiltration – Einfluss der Filtrationstemperatur und des pH-Werts

Bei der Ultrafiltration wurde die Filtrationstemperatur (20 und 50°C) und der pH-Wert von 6,0 bis 7,5 variiert. Bei 20 °C konnte kein ausreichender Flux erreicht werden, so dass diese Versuche nicht vielversprechend waren (Abbildung 9-7). Die weiteren Versuche wurden daher mit einer Temperatur von 50 °C durchgeführt. Insgesamt war der Flux bei 50 °C unabhängig vom Filtrations-pH-Wert im untersuchten Bereich.

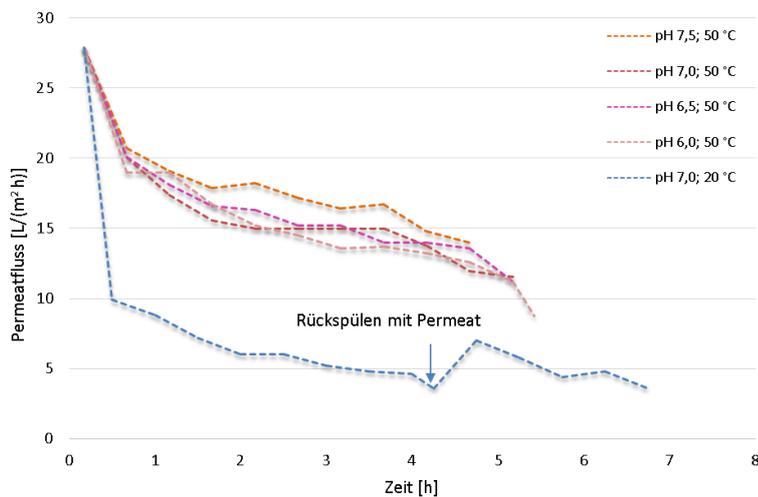


Abbildung 9-7: Flux durch die Ultrafiltrationsmembran in Abhängigkeit der Filtrationstemperatur und des pH-Werts

Die UFA, die TSA und die PGA variierten jedoch unter den untersuchten pH-Bedingungen. So waren die Ausbeuten bei pH 6,0 minimal und stiegen bis zu einem pH-Wert von 7,0 an. Anschließend sanken die Ausbeuten wieder ab (Abbildung 9-8). Bei pH 6,0 konnte zudem eine Fällung der Proteine im Retentat beobachtet werden.

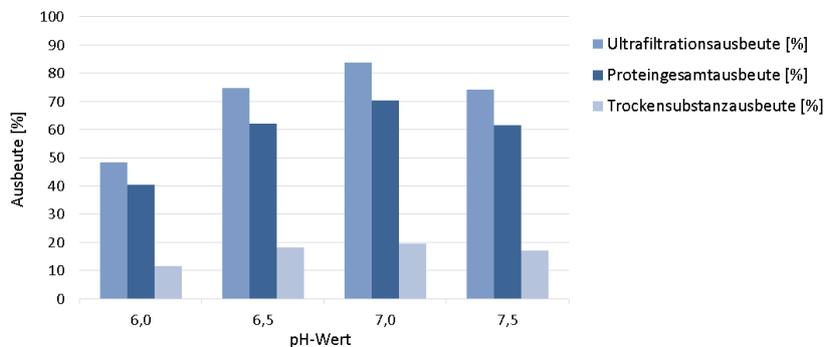


Abbildung 9-8: Einfluss des Filtrations-pH-Werts auf die Ausbeuten

Die Proteinlöslichkeiten und das Denaturierungsverhalten der Proteine wurden durch die Variation des pH-Werts bei der Ultrafiltration nicht beeinflusst. Allerdings wiesen die durch Ultrafiltration gewonnenen Erbsenproteinisolate geringere Proteinlöslichkeiten auf als die durch isoelektrische Fällung gewonnenen Isolate. Dies könnte auf die Filtrationstemperatur von 50 °C zurückzuführen sein, da bei dieser Temperatur bereits eine beginnende Proteindenaturierung ermittelt wurde.

Für die Untersuchungen zur Ultrafiltration in Kombination mit einer Diafiltration und der Ultrafiltration in Kombination mit der thermischen Fällung wurde die Filtration bei pH 7,0 und 50 °C durchgeführt.

Die Diafiltration führte zu einer signifikanten Verschlechterung der Proteinausbeute von etwa 70% bei der Ultrafiltration bei pH 7,0 auf etwa 55%. Der Proteingehalt der Isolate konnte durch die Diafiltration nicht gesteigert werden. Dies deutet daraufhin, dass zusammen mit niedermolekularen Substanzen auch Proteine durch die Membran permeierten und diese mit dem Permeat abgezogen wurden.

Durch die Kombination der Ultrafiltration mit einer thermischen Fällung bei 95 °C für 30 min wurde die geringste Ausbeute mit etwa 42% erzielt. Das thermisch gefällte Isolat wies zudem mit 16% die schlechteste Proteinlöslichkeit aller untersuchten Isolate auf (Abbildung 9-9). Ebenso konnte kein Denaturierungspeak ermittelt werden, was auf die weitgehende Denaturierung der Proteine durch die thermische Behandlung hinweist.

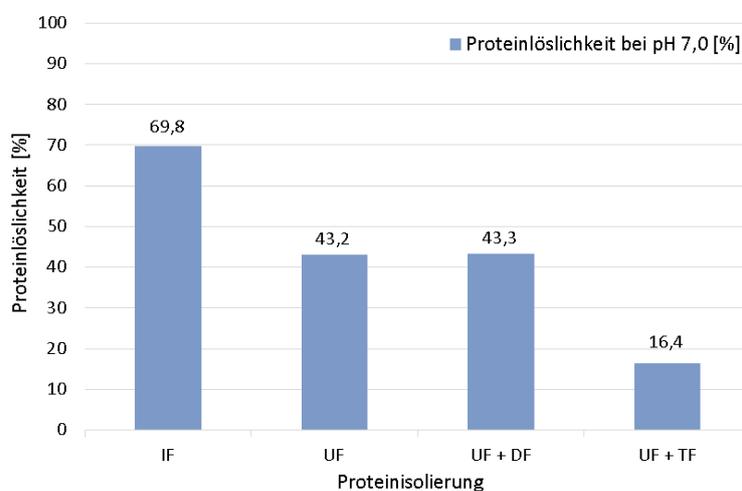


Abbildung 9-9: Überblick über die Proteinlöslichkeiten der Isolate aus den verschiedenen Isolaierungsverfahren (IF: isoelektrische Fällung; UF: Ultrafiltration; UF + DF: Ultrafiltration + Diafiltration; UF + TF: Ultrafiltration + thermische Fällung)

9.5 Einfluss der hydrothermischen Vorbehandlung des Erbsenmehls

Zur Enzymaktivierung (v.a. Lipoxygenase) wurde eine hydrothermische Vorbehandlung des Erbsenmehls untersucht. Dabei wurde auf Erkenntnisse aus der Literatur und aus eigenen Arbeiten des IVV zurückgegriffen. Das Erbsenmehl wurde bei 100 °C für 5 min und 100 % Luftfeuchtigkeit behandelt, anschließend nachgetrocknet und für die Extraktion verwendet.

Hierbei zeigte sich, dass die PGA durch die hydrothermische Behandlung leicht verringert wurde. So wurde bei nativem Erbsenmehl eine PGA von 69,4% erzielt, während bei hydrothermisch behandeltem Mehl die PGA auf 63,6% sank. Das Isolat hatte vergleichbare Eigenschaften wie das aus unbehandeltem Erbsenmehl.

10 Scale-up in den Technikumsmaßstab (AP 7)

Nach Abschluss der Verfahrensoptimierung und der sensorischen Bewertung der Isolate durch FS 1 wurden 2 vielversprechende Verfahren, die sich in den Extraktions- und Isolierungsbedingungen unterschieden an FS 2 in den Technikumsmaßstab übertragen.

Hierfür wurden jeweils 180 kg geschältes Erbsenmehl als Rohstoff für die Extraktion eingesetzt. Im Rahmen von V1 wurde die Extraktion bei pH 8,5; 30 °C mit einem s:l-Verhältnis von 1:10 durchgeführt. Die Trennung des Proteinextrakts vom Überstand erfolgte mittels eines Dekanters. Die im Proteinextrakt enthaltenen Proteine wurden isoelektrisch mit 3 M HCl bei pH 4,5 gefällt. Der Proteinquark wurde anschließend mit 3 M NaOH neutralisiert, pasteurisiert (72 °C, 3 min) und sprühgetrocknet. Insgesamt wurden hierbei 13,2 kg Erbsenproteinisolat erhalten. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 10-1 dargestellt. Das Isolat hatte zudem eine Proteinlöslichkeit von 53,8% bei pH 7 und eine Emulgierkapazität von 565 ml/g. Die funktionellen Eigenschaften waren daher den kommerziell erhältlichen Mustern überlegen.

Im zweiten Versuch V 2 wurden die Erbsenproteine bei pH 7,5, Raumtemperatur und s:l = 1:10 extrahiert. Die Trennung erfolgte analog zu V1. Der Proteinextrakt wurde anschließend bei pH 5,0 gefällt und über einen Separator wurde der Proteinquark vom Fällungsüberstand in einer Flüssig-Flüssig-Trennung getrennt. Der Proteinquark wurde, wie für V 1 beschrieben, weiterbehandelt. Insgesamt wurden bei Versuch 2 11,2 kg Erbsenproteinisolat gewonnen. Die etwas geringere Ausbeute war aufgrund der Laborversuche zu erwarten. Die Zusammensetzung dieses Isolat ist in Tabelle 10-1 dargestellt. Die funktionellen Eigenschaften waren vergleichbar zu V 1.

Tabelle 10-1: Zusammensetzung der Isolate aus dem Scale-up

Isolatbezeichnung	TS (%)	Protein (% d. TS)		Asche (% d. TS)	Fett (% d. TS)
		N*6,25	N*5,5		
Erbsenproteinisolat IVV V1	94,2	85,1	74,9	6,1	8,5
Erbsenproteinisolat IVV V2	95,9	86,8	76,4	5,7	7,3

11 Applikationsstudien (AP 8)

An Forschungsstelle 2 wurden unterschiedliche Applikationen mit dem in AP 7 hergestellten Erbsenproteinisolaten und einem kommerziellen Erbsenproteinisolat hergestellt und bewertet. Mit den Isolaten wurden milchähnliche Drinks mit einem Proteingehalt von 2-4%, pflanzliche Mayonnaisen mit Proteingehalten zwischen 0,5 und 1% und vegane Streichpasten mit einem Proteingehalt von 15% hergestellt. Dabei zeigte sich, dass die Herstellung einer Mayonnaise sowohl mit kommerziellem Erbsenproteinisolat als auch mit dem im Rahmen des Vorhabens optimierten Isolaten ohne Probleme möglich war. Auch die sensorischen Eigenschaften der Produkte unterschieden sich nur marginal. Größere Auswirkungen zeigten sich bereits bei den milchähnlichen Getränken. Hier waren deutlich Unterschiede in der Stabilität der Drinks und in der Sensorik bereits bei Anwendungskonzentrationen von 3% zu verzeichnen. Die im Rahmen des Vorhabens hergestellten Produkte schnitten dabei durchweg besser ab. Ebenso wurden die Streichpasten mit 15% Erbsenprotein aus den im Rahmen des Vorhabens optimierten Isolaten als sensorisch ansprechender beurteilt.

12 Material und Methoden

12.1 Bestimmung der Zusammensetzung der Isolate

Die Bestimmung des Trockensubstanzgehalts erfolgte durch Trocknung bei +105 °C bis zur Gewichtskonstanz mit dem Analysesystem TGA 601 der Firma Leco nach den in § 64 Abs. 1 + 2 LFGB aufgeführten Methoden.

Die Bestimmung des Aschegehalts der bei +105 °C vorgetrockneten Proben erfolgte durch Veraschung bei +950 °C unter Sauerstoffatmosphäre bis zur Gewichtskonstanz im selben Analysensystem (Leco TGA 601) (Methode nach § 64 Abs. 1 + 2 LFGB).

Der Gesamtproteingehalt wurde indirekt über Stickstoffbestimmung durch Verbrennungsanalyse nach der Methode von Dumas ermittelt (*Schwedt, 1996*). Zur Berechnung des Proteingehaltes wurde der realen Konversionsfaktoren für Soja von 5,7 (*Sosulski und Sarwar, 1973; Morr, 1982*), für Erbse von 5,5 (*Sosulski und Holt, 1980*) und für Raps von 5,6 (*Sosulski und Sarwar, 1973*) verwendet. Die Stickstoffbestimmung wurde mit dem Leco-System FP-528 durchgeführt. Die entgaste Probe wurde in einer Sauerstoffatmosphäre bei +850°C verbrannt. Die entstehenden Verbrennungsgase werden gesammelt, filtriert und gekühlt und zur Reduktion über einen Kupferreaktor geleitet. Hierbei wird u.a. NO_x zu N₂ reduziert. Nach Abtrennung von CO₂ und H₂O mittels selektiven Absorbern wird das verbleibende Gas mit einem Trägergas (Helium) in eine Wärmeleitfähigkeitsmesszelle geleitet und die Konzentration des Stickstoffs bestimmt (*Schwedt, 1996*).

12.2 Bestimmung der Produktfarbe

Die Farbbestimmung der getrockneten Erbsenproteinisolate wurde mithilfe des Messgerätes DigiEye VeriVide, einer computergesteuerten digitalen Kamera für Farbmessungen, durchgeführt. Die Proben wurden in einem geschlossenen Probenraum fotografiert, wo durch die Lichteinstellung D65 (mittleres Tageslicht) eine gleichmäßige und reproduzierbare Helligkeit erreicht wurde. Das DigiEye besteht aus einem DigiEye Cube und einer SLR-Kamera, die mit dem Computer verbunden ist.

Die Proben wurden aufgrund ihrer hellen Farbe auf einem blauen Hintergrund abgelichtet. Zur Vergleichbarkeit der Proben wurde das Isolat aus dem vollfetten Erbsenmehl jeweils mitgemessen. Mit Hilfe des Softwareprogramms DigiEye V2.61 wurde die Auswertung der Farbwerte durchgeführt. Die ermittelten L*a*b*- Werte wurden für den Farbvergleich der Isolate verwendet. Zusätzlich wurden Chroma C*, hue-value h° und delta E im Vergleich zum vollfetten Isolat berechnet. Aus L*a*b* lassen sich der Farbton h° (9) und die Buntheit C* (10) und wie folgt berechnen:

$$\text{Farbton (Hue): } h^{\circ}_{ab} = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (1)$$

$$\text{Buntheit (Chroma): } C^*_{ab} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (2)$$

12.3 Bestimmung der Partikelgrößenverteilung kommerzieller Isolate

Die Partikelgrößen-Verteilungen der kommerziell erhältlichen Proteinisolate wurden mittels Laserbeugungsmesssystem der Firma Malvern (MasterSizer, Software Version 2.19) gemessen. Der optische Aufbau der Linse mit 300 mm Brennweite (RF 300), aus der sich eine Erfassungsgrenze von 0,05 - 980 µm ergibt, deckte den Partikelgrößenbereich der Pulver ab. Als Dispergiermedium wurde in der Small Volume Dispersion Unit etwa 150 ml 1-Butanol eingesetzt und die Konzentration der Pulver in der Messdispersion auf 10-15 % Abschattung eingestellt. Vor und während der Messung wurde mit 3000 rpm gerührt und die Dispersion durch die Messzelle gepumpt. Um eine homogene Dispergierung der Partikel zu erreichen und um die Messung nach einem definierten Zeitintervall durchzuführen, wurde die Messung 2 Minuten nach dem Erreichen der Abschattung von über 10% gestartet. Für die Berechnung der Partikelgröße nach der Mie-Theorie wurde eine polydisperse Verteilung der Isolate in 1-Butanol angenommen. Der reale Brechungsindex (RI) der Pulver ist unbekannt, weshalb die Standard Wet Parameter (RI_{H₂O} 1,33, und RI_{Pulver} 1,56) angenommen wurden. Jeder Ansatz wurde zweimal gemessen, woraus sich ein Zeitintervall ab Probenzugabe von 2 und 3 Min. für die beiden Messungen ergibt. Jede Messung an sich stellt eine Doppelbestimmung (2x 6000 Ereignisse) dar und die zwei Einzelergebnisse sind als arithmetischer Mittelwert angegeben. Alle Ergebnisse sind Volumen basiert.

12.4 Fraktionierung von Erbsenproteinen

Als Ausgangsmaterial für die Versuche wurde Erbsenmehl aus geschälten Erbsen der Sorte *Pisum sativum* var. Astronauta verwendet. Die Erbsensamen wurden zur Herstellung des Mehls zunächst mittels Unterläufer-Schälgang (Streckel & Schrader KG) geschält und die Kernfraktion von den Schalen mit Hilfe eines Zick-Zack-Sichters (Streckel & Schrader KG) getrennt. Die geschälten Erbsensamen wurden anschließend in einer Feinprallmühle (HOSOKAWA ALPINE) mit einem 0,5 mm Sieb vermahlen. Das Mehl wurde bei 14 °C bis zur Durchführung der Versuche gelagert. Die Zusammensetzung des Erbsenmehls ist

Tabelle 12-1 zu entnehmen.

Tabelle 12-1: Zusammensetzung des Erbsenmehls

	TS (%)	Protein (% d. TS) N*5,5	Fett (% d. TS)	Asche (% d. TS)
Erbsenmehl	89,1	19,3	2,4	2,3

12.4.1 Extraktion und Abtrennung der Erbsenglobuline nach dem Verfahren von Klassen [6]

600 g Erbsenmehl wurden in einem 4 L-Doppelmantelreaktor mit 50 mM K_2HPO_4 /0,5 M NaCl-Puffer mit einem s:l-(Feststoff:Flüssigkeits-)Verhältnis von 6 mL Puffer pro 1 g Mehl vermischt und für 1 h bei Raumtemperatur (RT) (pH 7,2; 1 M NaOH) extrahiert. Anschließend wurde die Extraktionsansatz bei 3300*g für 15 min bei RT zentrifugiert und der Rückstand vom proteinhaltigen Überstand getrennt. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen an kaltem Leitungswasser (ca. 10 °C) verdünnt und der pH-Wert der Suspension wurde 3 M HCl auf 4,5 gesenkt. Anschließend wurde die Suspension bei 4 °C für 1 h gelagert, um die Präzipitation der Globuline zu unterstützen. Die gefällte Globuline, die die beiden Proteinfractionen Legumin und Vicillin enthalten, wurden durch erneute Zentrifugation (3300 g, 15 min.) abgetrennt, mit 200 mL demin. Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert, um anhaftende Substanzen weiter zu reduzieren. Das erhaltene Feststoff-Pellet (enthält Legumin und Vicillin) wurde in 50 mM K_2HPO_4 /0,5 M NaCl-Puffer (pH 7,2) mit einem s:l-Verhältnis von 3 mL Puffer pro 1 g Pellet gelöst und erneut zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand enthält nun Legumin und Vicillin. Das verbleibende Pellet würde erneut in 50 mM K_2HPO_4 /0,5 M NaCl-Puffer (pH 7,2) suspendiert, um möglichst alle Globuline zu lösen. Die erhaltenen Überstände wurden vereinigt und für die fraktionierte Fällung eingesetzt (13.4.2).

12.4.2 Vereinfachtes Extraktionsverfahren

Da die Extraktion nach Klassen [6] sehr zeitaufwändig ist und große Mengen an Pufferlösung verbraucht werden, wurde die Proteinextraktion in weiteren Versuchen vereinfacht. Dazu wurde 1 kg Erbsenmehl in Leitungswasser mit einem s:l-Verhältnis von 1:8 suspendiert und für 1 h bei RT (pH 8,0) extrahiert.

Die Mischung wurde danach bei 3300*g und RT für 10 min zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde mittels 1 M HCl auf pH 4,5 eingestellt, um die Globulinfraktion isoelektrisch zu fällen. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugieren (3300*g, RT, 10 min) vom Überstand getrennt. Der globulinhaltige Rückstand wurde mit demin. Wasser resuspendiert und mit 1 M NaOH auf pH 6,8 eingestellt. Für die weiteren Fraktionierungsversuche wurde jeweils eine Menge von 50 g Suspension aufgetaut, mit 50 g K_2HPO_4 /NaCl-Puffer (0,1 M K_2HPO_4 ; 1 M NaCl) verdünnt und auf pH 7,2 eingestellt. Danach erfolgte eine Zentrifugation (3300*g, RT, 10 min), um die gelösten Globuline vom unlöslichen Rückstand abzutrennen. Der erhaltene

Rückstand wurde erneut mit 50 g K₂HPO₄/NaCl-Puffer suspendiert, diesmal allerdings mit Konzentrationen von 0,05 M K₂HPO₄ und 0,5 M NaCl, um die bereits stattgefundenen Verdünnung durch demin. Wasser zu korrigieren und eine vergleichbare Konzentration der Puffer wie bei Klassen [6] zu erhalten. Die Überstände wurden vereinigt und für die weitere Fraktionierung der Proteine verwendet (13.4.3).

12.4.3 Fraktionierte Fällung von Legumin und Vicillin

Die erhaltenen Überstände wurden gegen McIlvaines-Puffer (0.2 M Na₂HPO₄/0.1 M Citronensäure/0,2 M NaCl; pH 4.8) mit einem s:l-Verhältnis von 4 mL Puffer pro 1 mL Überstand bei 4 °C für 30 h dialysiert (12 bis 14 kDa cut-off). Anschließend wurde das Dialysat zentrifugiert und dabei eine Legumin-angereicherte Fraktion als Präzipitat gewonnen. Das Legumin-Präzipitat wurde in Wasser resuspendiert, und mit NaOH auf pH 6,8 neutralisiert. Der Vicillin-haltige Überstand wurde mit 1 M HCl auf pH 4,5 eingestellt, um das verbleibende Vicillin auszufällen. Die Mischung wurde zentrifugiert und das Vicillin-angereicherte Pellet in demin. Wasser gelöst, auf pH 6,8 eingestellt. Beide Fraktionen wurden bei -20 °C bis zur Analyse mit SDS-PAGE aufbewahrt.

12.4.4 Gewinnung von Erbsenalbuminen

Für die Gewinnung der Albumine aus der Erbse wurde ein Extraktionsverfahren nach Tian et al. durchgeführt [7]. Hierzu wurden 100 g Erbsenmehl mit 1000 mL 0,5 M NaCl-Lösung suspendiert und bei RT für 80 min extrahiert. Der pH-Wert der Suspension betrug hierbei 6,0. Zur Abtrennung der nichtgelösten Stoffe wurde der Ansatz bei 7500 g für 20 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand mit den enthaltenen Proteinen wurde in Dialyseschläuche (12 bis 14 kDa) gefüllt und für zwei Tage gegen dest. H₂O dialysiert. Das Dialysat wurde insgesamt dreimal gewechselt. Am zweiten Tag zeigte sich eine deutliche Trübung der Proteinlösung. Die durch die Senkung des Salzgehalts ausgefallenen Globuline wurden nach Ende der Dialyse durch Zentrifugation (7500 g, 20 min) von den in Lösung verbliebenen Albuminen getrennt.

12.5 Fraktionierung von Rapsproteinen

Für die Gewinnung von Einzelfractionen aus Raps wurde ein CO₂-entölter, teilgeschälter Presskuchen der Teutoburger Ölmühle verwendet; die Zusammensetzung ist in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 12-2: Zusammensetzung des CO₂-entölkten, teilgeschälten Rapspresskuchens

	<i>TS (%)</i>	<i>Protein (% d. TS)</i>	<i>Fett (% d. TS)</i>	<i>Asche (% d. TS)</i>
CO ₂ -entölter Rapspresskuchen	95,0	47,2	3,1	7,3

12.5.1 Gewinnung Cruziferin- und Napin-angereicherter Fraktionen mittels IVV-Verfahren

Für die Fraktionierung in eine Cruziferin-angereicherte und in eine Napin-angereicherte Fraktion wurde auf ein im Fraunhofer IVV entwickeltes Extraktionsverfahren mit isoelektrischer Fällung und Ultrafiltration des sauren Vorextrakts zurückgegriffen und für die Zielsetzung des Projektes angepasst. Als Maßstabsgröße wurden ein 10 L-Ansatz genutzt, um für die weiteren Aufreinigungen der Grobfraktionen ausreichend identisches Material zu gewinnen. Eine Übersicht des Verfahrens ist Abbildung 12-1 zu entnehmen. In einem 10 L-Doppelmantel-Edelstahlreaktion (IVV Eigenbau) wurden 8038 g demin. H₂O (15°C) vorgelegt, der pH-Wert mit Salzsäure (1 M HCl, p.A.) auf 4,0 eingestellt. Der entölte Rapspresskuchen (803 g) wurde unter Rühren (IKA, Eurostar; Propeller Rührer U = 300 1/min) bei konstantem pH-Wert innerhalb 10 min. zugegeben. Während der Extraktionszeit von 48 min wurde der pH-Wert konstant gehalten (pH 4,0). Die Trennung der 1. Vorextraktion erfolgte mit einer Zentrifuge (SIGMA 8K mit Rotor 11805 und 1 L Zentrifugengefäßen) bei 3500 g für 10 min bei Raumtemperatur. Das Sediment wurde einer zweiten Vorextraktion zugeführt. Analog zur ersten Vorextraktion wurde demin. H₂O (5700 g) mit einem pH-Wert von 4,0 vorgelegt und das Sediment der ersten Vorextraktion eingerührt. Während der zweiten Extraktionszeit von 30 min wurde ebenfalls der pH-Wert konstant bei pH 4,0 gehalten. Die Temperatur stieg dabei auf 25 °C (Raumtemperatur) an. Die Trennung erfolgte analog zur ersten Vorextraktion. Die Überstände aus der ersten und der zweiten Vorextraktion wurden vereinigt und für die Gewinnung einer Napin-angereicherten Fraktion verwendet.

Gewinnung Cruziferin-angereicherte Fraktion

Als nächster Verfahrensschritt wurde die Proteinextraktion durchgeführt. Hierfür wurden 10000 g Wasser im Doppelmantel-Reaktor auf 30 °C erhitzt (Thermostat Lauda E 200 und RE 207), mit 1 M NaOH (p.A.) auf pH 8,5 eingestellt und der Rückstand der 2. Vorextraktion eingerührt. Während der Extraktionszeit von 75 min wurdend er pH-Wert und die Temperatur konstant gehalten. Die Suspension wurde zentrifugiert (5000 g, 10 min.) und der Überstand wurde der Fällung zugeführt. Das Sediment wurde verworfen. Zur isoelektrischen Fällung des Cruziferins wurde ein pH-Wert von 4,0 eingestellt und durch Zentrifugation (3500 g, 10 min., 30 °C) das Sediment (konzentriertes Protein) vom Fällungsüberstand getrennt. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 474 g demin. H₂O (pH 4,0) nachgewaschen. Die Trennung mit Zentrifuge erfolgte analog zur Fällung. Um die gefällte Proteinfraction zu neutralisieren, wurde das Sediment in 450 g demin. H₂O suspendiert und der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 7,5 eingestellt. Die neutralisierte Proteinsuspension wurde gefriergetrocknet (Christ Beta 1-8 mit Anlagensteuerung LMC-2).

Gewinnung Napin-angereicherte Fraktion

Aus den Überständen der beiden Vorextraktionen wurde eine Napin-angereicherte Fraktion gewonnen. Dafür wurden beide Überstände vereint, gesiebt (Analysensieb 80 µm, Retsch

Durchmesser 400 mm) und über die Ultrafiltration (IVV Eigenbau, 10 kDa) konzentriert. Die Überstände wurden vor der Ultrafiltration auf einen pH Wert von 6,0 (1 M NaOH, p.A.) eingestellt und die Suspension auf 25-50 °C temperiert. Das Retentat wurde nach Aufkonzentrierung durch die Ultrafiltration neutralisiert (pH 7,0) und anschließend mit demin. H₂O diafiltriert wird. Die Permeate der Ultrafiltration und der Diafiltration wurden verworfen. Das Napin-angereicherte Proteinretentat wurde analog der Cruziferin-angereicherten Fraktion gefriergetrocknet.

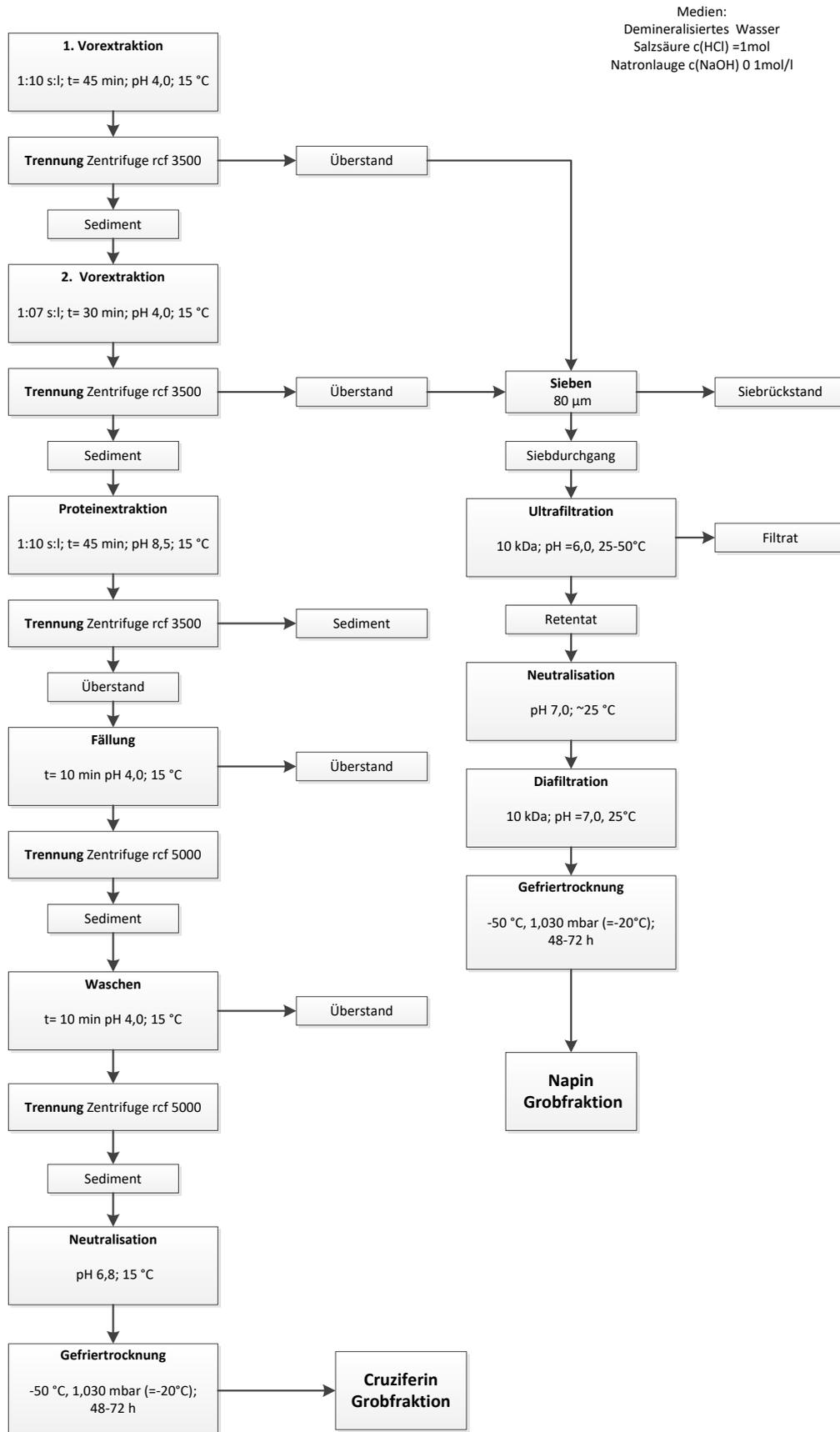


Abbildung 12-1: Verfahrensschema zur Gewinnung von Cruziferin- und Napin-angereicherten Fraktionen aus CO₂-entöltem Rapspresskuchen

12.5.2 Extraktionsverfahren nach Bérot, Compoin [10]

Die Extraktion von Rapsproteinen orientierte sich in der Durchführung an Bérot, Compoin [10] und erfolgte in drei Ansätzen nach gleichem Vorgehen, während lediglich die Zusammensetzung des Extraktionsmittels variiert wurde. Im ersten Ansatz (A1) wurde der Puffer mit allen Komponenten verwendet (Tabelle 12-3). Hierzu wurden 6,056 g Tris, 43,826 g NaCl, 3,007 g NaHSO₃ sowie 1,461 g EDTA eingewogen und in etwa 900 mL dest. H₂O gelöst. Die Lösung wurde mit 3 M NaOH auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt. In einem 1000 mL-Messkolben wurde der Puffer mit HPLC-Wasser bis zum Eichstrich aufgefüllt. Für den zweiten Ansatz (A2) wurde der Puffer nach gleichem Vorgehen ohne EDTA und für den dritten Ansatz (A3) ohne EDTA und ohne NaCl hergestellt. Hierdurch sollte der Einfluss der Salzkonzentration sowie von Extraktionshilfsmitteln (EDTA) auf die Ausbeute und die Reinheit von Rapsproteinen untersucht werden. NaHSO₃ wurde eingesetzt, um eine Oxidation von Polyphenolen zu verhindern und somit die Bindung von Polyphenol-Derivaten an die Rapsproteine zu unterbinden.

Tabelle 12-3: Zusammensetzung des Puffers für die Raps-Extraktion

Bestandteil	Menge	Endkonzentration
EDTA (M = 292,24 g/mol)*	1,461 g	5 mM
dest. H ₂ O	900 mL	
HPLC-Wasser		
NaCl (M = 58,44 g/mol)**	43,826 g	0,75 M
NaHSO ₃ (M = 104,06 g/mol)	3,007 g	0,3%
NaOH (3M)		
Tris (M = 121,14 g/mol)	6,056 g	0,05 M

*nur im ersten Ansatz (A1) enthalten; **nur im ersten und zweiten Ansatz (A1 + A2) enthalten

Für die Extraktion wurden 100 g CO₂-entölter Rapspresskuchen eingewogen und in 1000 mL Puffer (Tabelle 12-3) suspendiert. Die Mischung wurde 1 h bei RT und einem pH-Wert von pH 7,6 – 8,0 gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit 7500 × g für 20 min bei RT zentrifugiert. Der Rückstand der ersten Extraktion wurde erneut in 1000 mL Puffer suspendiert und 1 h bei RT und einem pH-Wert von pH 8,3 – 8,4 gerührt. Die Suspension wurde erneut mit 7500 × g für 20 min bei RT zentrifugiert. Die proteinhaltigen Überstände aus beiden Zentrifugationen wurden gesammelt, vereinigt und bis zur weiteren Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

12.6 Aufreinigung der Proteinfractionen aus Erbse, Soja und Raps

12.6.1 Untersuchung der säulenchromatographischen Aufreinigung von Erbsenproteinfraktionen

Eine Chromatographiesäule mit 29 mm Durchmesser und 60 cm Länge wurde zunächst mit einer dünnen Schicht Glaswolle befüllt. Anschließend wurde die DEAE-Sepharose Fast Flow (GE Health Care) nach Anweisung vorbereitet. DEAE-Sepharose wurde in Citrat-Phosphat-Puffer (0,16 M, pH 7,0) aufgeschlämmt und über Nacht zum Ausquellen stehen gelassen und am nächsten Tag blasenfrei in die Chromatographie-Säule gefüllt. Das Gelbett wurde anschließend mehrmals mit Citrat-Phosphat-Puffer equilibriert.

Für die säulenchromatographische Trennung wurde die isoelektrisch gefällte, neutralisierte Proteinsuspension der alkalischen Extraktion verwendet. Diese Proteinsuspension wies einen TS-Gehalt von 15,6% auf. Für die Säulenchromatographie wurde diese Suspension auf einen TS-Gehalt von 5% mit Citrat-Phosphat-Puffer (0,16 M, pH 7,0) verdünnt und filtriert. Pro 1 mL Gelbett wurden 0,5 mL Proteinextrakt auf die Säule aufgebracht (Fraunhofer IVV). Die Trennung der Proteine erfolgte durch Elution mit verschiedenen konzentrierten NaCl-Lösungen über einen stufenweisen Gradienten von 0,05 M NaCl über 0,25 M NaCl bis zu 0,5 M NaCl [12]. Die eluierten Fraktionen wurden in 5 mL Eppendorf-Tubes gesammelt und mittels SDS-PAGE auf ihre qualitative Zusammensetzung untersucht.

12.6.2 Säulenchromatographische Aufreinigung von Raps-Cruciferin mittels Sephacryl 200 HR

Die mit Sephacryl 200 HR (GE Life Science) gefüllte Chromatographiesäule (Durchmesser 20 mm, V_{Bed} in 20 % Ethanol = ~ 28 ml) wurde mit einem Puffergemisch aus Tris-HCl ($c=0,05$ mol/l) und Natriumchlorid ($c = 1$ mol/l) (pH 8,5), konditioniert. Mit dem Konditionierungspuffer wurde die Cruciferin-angereicherte Fraktion suspendiert und eine 5 %ige Proteindispersion hergestellt. Diese wurde zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile bei 20000 g zentrifugiert (Sigma 3K30). Die im Überstand kolloidal gelösten Proteine wurden auf die Säule ($V = 10$ ml, m Protein = 0,73 g) aufgegeben und mit 120 mL des oben beschriebenen Puffers eluiert. Das Eluat wurde in Eppendorf-Tubes gesammelt und für die Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

12.6.3 Adsorption von Polyphenolen aus der Napin-angereicherten Fraktion

Um die in der Napinfraktion enthaltenen sekundären Pflanzenstoffe abzureichern, wurden auf Basis vorangegangener Projekte ein Verfahren zur Adsorption von Polyphenolen verwendet. Hierfür wurden 100 ml einer 5 %igen Dispersion aus der Napin-angereicherten Fraktion hergestellt. Als Adsorbens wurden 20 g Amberlite XAD 16 verwendet, die zuvor mit 100 ml demineralisiertem Wasser vorbereitet und gequollen wurden. Das Adsorbens und die Proteindispersion wurden 3,25 Stunden mit einem Magnetrührer gerührt. Anschließend

wurden Adsorbens und flüssige Phase mittels Filtration (Whatmann 597 ½ Faltenfilter) getrennt.

Um den Adsorber wieder zu regenerieren und anhaftendes Protein abzuspülen wurde der Adsorber mit einem Citratpuffer-Phosphatpuffer aufgeschüttelt und anschließend über einen Faltenfilter filtriert.

12.6.4 Aufreinigung der Napin-angereicherten Fraktion aus Raps mittels DEAE-Sepharose

5 g der Napin-angereicherten Fraktion wurden in 95 g Puffer aus 0,16 mol/l Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung, die mit 0,16 mol/l Zitronensäure auf einen pH Meter von 7,0 eingestellt wurde (Konditionierungspuffer), mit einem Turrax Stab 1 min dispergiert, 5 min gequollen und erneut 1 min mittels UltraTurrax dispergiert. Für die Trennung der unlöslichen Bestandteile wurde die Suspension filtriert (Whatman Filter 597 ½). Der erhaltene gräulich weiße Filterkuchen wurde verworfen und das klare, bräunlich gefärbte Filtrat wurde für die säulenchromatographische Trennung verwendet.

Für die Trennung wurde eine mit DEAE Sepharose FastFlow (GE Healthcare BA) gefüllte Chromatographiesäule mit 150 ml Kodnitionierungspuffer equilibriert. Als Probenvolumen wurden 20 ml der im gleiche Puffer gelösten Napin-angereicherten Fraktion auf die Säule aufgetragen. Als Eluent wurde der Konditionierungspuffer mit steigenden Konzentrationen NaCl versetzt und Puffer mit 0,05, 0,25, 0,5 und 1 mol/l NaCl hergestellt. Die Eluierung der Proteine erfolgte durch schrittweise Zugabe der NaCl-Puffer in steigender Konzentration. Die Probennahme der Eluenten wurde in 5 ml Schritten durchgeführt und in dieser Reihenfolge für Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-PAGE verwendet (Abbildung XY).

12.7 Fraktionierung von Sojaproteinen

Durch die fraktionierte Fällung von Sojaproteinen, die nach Vorgaben von Puppò, Beaumal [13] durchgeführt wurde, sollten die 7S- und die 11S-Proteinfractionen getrennt gewonnen werden. Dazu wurden 200 g Hexan-entölte Sojaflocken auf 3000 mL dest. H₂O gegeben und mit 1 M NaOH auf pH 8,0 eingestellt. Die Suspension wurde bei RT für 2 h gerührt und anschließend mit 7500 × g für 20 min zentrifugiert. Dem Überstand wurden 0,98 g/L trockenes NaHSO₃ hinzugegeben und der pH-Wert mit 1 M HCl auf 6,4 eingestellt. Der Ansatz wurde über Nacht (etwa 20 h) bei 4°C gelagert. Nach einer weiteren Zentrifugation mit 6500 × g für 15 min bei 4°C konnte die 11S-Fraktion aus dem Rückstand gewonnen werden. Der Rückstand wurde mit 1:4 dest. H₂O aufgeschlämmt, mit 1 M NaOH neutralisiert (pH 7,0) und für 2 Tage gegen dest. H₂O dialysiert.

Dem Überstand der Fällung wurden 14,61 mg/L NaCl hinzugegeben und der pH-Wert mit 1 M HCl auf pH 5,0 eingestellt. Der Ansatz wurde bei RT für 1 h gerührt und anschließend mit 7500 × g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:2 mit dest. H₂O verdünnt und der pH-Wert

mit 1 M HCl auf pH 4,8 eingestellt. Der Ansatz wurde für 30 min bei RT gerührt und anschließend mit $6500 \times g$ für 15 min zentrifugiert. Der Rückstand mit der enthaltenen 7S-Fraktion wurde 1:2 mit dest. H₂O aufgeschlämmt und der pH-Wert erneut mit 1 M HCl auf pH 4,8 eingestellt. Der Ansatz wurde für 30 min bei RT gerührt und erneut mit $6500 \times g$ für 15 min zentrifugiert. Der gewaschene Rückstand wurde 1:4 mit dest. H₂O aufgeschlämmt, mit 1 M NaOH neutralisiert (pH 7,0) und für 2 Tage gegen dest. H₂O dialysiert.

12.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen mit der Methode nach Laemmli durchgeführt [14]. Alle Proben wurden entsprechend ihrem Proteinanteil mit Probenauftragspuffer (Tabelle 12-4) und HPLC-Wasser auf eine vergleichbare Proteinkonzentration eingestellt. Die Proben, die reduzierenden Probenauftragspuffer mit DTT enthielten, wurden für 5 min bei 95°C im Heizblock erhitzt und anschließend für 2 min bei $12000 g$ zentrifugiert. Die Elektrophorese-Kammer wurde mit Elektrodenpuffer (Tabelle 12-6) befüllt und das vorgefertigte Gel (Criterion TGX Stain-Free 4-20 % Precast Gel, BioRad, München) in die Kammer eingesetzt. In die Probentaschen des Gels wurden 10 µL der vorbereiteten Proben und 5 µL Proteinmarker (Precision Plus Unstained, BioRad, München) pipettiert. Die Elektrophorese-Kammer wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen und die Elektrophorese mit 200 V, 60 mA und 100 W gestartet. Sobald die Lauffront des Bromphenolblau-Farbstoffs den unteren Gel-Rand erreicht hatte, wurde die elektrophoretische Auftrennung beendet. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe eines UV-Detektors. Die Molekulargewichte der Proteine wurden mit Hilfe der Software ImageLab 5.0 auf Basis der Molekulargewichte der Proteinstandards ermittelt.

Tabelle 12-4: Zusammensetzung des 2 x Probenauftragspuffer

Bestandteil	Menge	Endkonzentration
Bromphenolblau-Stammlösung	6 Tropfen	0,02%
DTT*	1,55 g	0,2 M
Glycerin (M = 92,09 g/mol)	10 mL	20%
HPLC-Wasser		
4x Sammelgelpuffer (Tabelle 12-5)	12,5 mL	0,125 M
SDS (M = 288,4 g/mol)	2,022 g	4%

* nur im Probenauftragspuffer für Trennung unter reduzierenden Bedingungen enthalten

Tabelle 12-5: Zusammensetzung des 4 x Sammelgelpuffers

Bestandteil	Menge	Endkonzentration
dest. H ₂ O	40 mL	
HCl (rauchend, 37%)		
HPLC-Wasser		
Tris (M = 121,14 g/mol)	3,021 g	0,5 M

Tabelle 12-6: Zusammensetzung des Elektrodenpuffers

Bestandteil	Menge	Endkonzentration
dest. H ₂ O	10 L	
Glycin (M = 75,07 g/mol)	144,135 g	0,192 M
SDS (M = 288,4 g/mol)	10,011 g	0,1%
Tris (M = 121,14 g/mol)	30,280 g	0,025 M

12.9 Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften

12.9.1 Bestimmung der Emulgierkapazität

Die Bestimmung der Emulgierkapazität wurde nach einer am IVV standardisierten Methode durchgeführt. Dabei wird die Emulgierkapazität durch kontinuierliche Zugabe von Öl (10 mL/min) zu einer Öl-in-Wasser-Emulsion (100 mL einer 1%igen Proteinlösung + 125 mL Öl) bis zur Phaseninversion der Emulsion bestimmt. Die Phaseninversion wird durch einen abrupten Zusammenbruch der elektrischen Leitfähigkeit detektiert. Die Emulgierkapazität wird angegeben in mL Öl/g Proteinprodukt und wurde mit folgender Gleichung ermittelt.

$$\text{Emulgierkapazität [mL/g]} = \frac{\text{Zugabe von Öl [mL]}}{\text{Einwaage Proteinisolat [g]}}$$

12.9.2 Bestimmung der Proteinlöslichkeit

Der Methode liegt das standardisierte Untersuchungsverfahren zur Bestimmung der Proteinlöslichkeit nach *Morr et al. (1985)* und des NSI-Wertes nach der offiziellen AOCS-Methode 11-65 (AOCS, 1998) bzw. AACC 44-23 (AACC, 2000a) zugrunde. 1000 mg der Produktprobe werden in ein 100 mL Becherglas eingewogen und mit 35 mL 0,1 M NaCl-Lösung dispergiert,

anschließend wird der entsprechende pH-Wert der Probe (pH 3 bis pH 9) durch Zugabe von 0,1 M NaOH bzw. HCl eingestellt. Diese Lösung wird in einen 50 mL Messkolben überführt und bis zur Marke aufgefüllt. 20 mL der Lösung werden bei 20.000 g bei 15 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird der Stickstoffuntersuchung unterzogen. Über Multiplikation des ermittelten Stickstoffgehalts mit den Konversionsfaktoren 5,7 für Soja, 5,5 für Erbse und 5,6 für Raps wird das im Überstand enthaltene (und somit gelöste) Protein nach folgender Formel berechnet.

$$\text{Proteinlöslichkeit(\%)} = \frac{50 \text{ mL} \times \text{PG}_{\text{Überstand}}}{1000 \text{ mg} \times \text{PG}_{\text{Isolat}} \times \text{TS}_{\text{Isolat}}} * 100$$

$\text{PG}_{\text{Überstand}}$ = Protein im Überstand [mg/mL]

$\text{PG}_{\text{Isolat}}$ = Protein im Isolat [% in der TS]

$\text{TS}_{\text{Isolat}}$ = TS des Isolats [%]

12.9.3 Bestimmung des Wasserbindevermögens

Die Bestimmung des Wasserbindevermögens orientiert sich an der AACC- Methode 56-20 (AACC, 2000b). Bezugsgröße ist die eingesetzte Trockensubstanz des Präparates.

2,00 ± 0,01 g der Probe werden in ein Zentrifugengläschen eingewogen und mit einem Überschuss an demineralisiertem Wasser (ca. 40 mL) dispergiert. Nach einer Quellzeit von 10 min wird der Ansatz 1.000 g bei 20 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, das Zentrifugenglas zurückgewogen und das Gewicht des mit Wasser gesättigten Präparates bestimmt. Das Wasserbindevermögen wird nach folgender Formel berechnet.

$$\text{Wasserbindevermögen} \left[\frac{\text{g}}{\text{g}} \right] = \frac{\text{Masse (Probe+gebundenes H}_2\text{O)}[\text{g}]-\text{Einwaage Probe} [\text{g}]}{\text{Einwaage Probe} [\text{g}]\times\text{TS Probe} [\%]}$$

12.9.4 Bestimmung des Ölbindevermögens

Die Bestimmung des Ölbindevermögens wurde mit den in der Literatur beschriebenen Methoden bestimmt (Lin et al., 1974; Ludwig et al., 1989 und Lasztity, 1989). Von der Probe werden genau 3,00 g in ein graduiertes 25 mL Zentrifugenglas eingewogen. Es werden 20 mL Öl zugegeben und 1 min gut vermischt. Anschließend wird der Ansatz bei 700 g bei 20 °C für 15 min zentrifugiert. Das nicht gebundene Öl wird mittels der Graduierung des Zentrifugegefäßes bestimmt. Das Ölbindevermögen wird nach folgender Formel berechnet.

$$\text{Ölbindevermögen} \left[\frac{\text{mL}}{\text{g}} \right] = \frac{20 \text{ mL} - \text{Volumen ungebundenes Öl} [\text{mL}]}{\text{Einwaage der Probe} [\text{g}]}$$

12.10 Charakterisierung der Thermostabilität der Proteinisolate

Um Aussagen über die Thermostabilität der Proteinpräparate treffen zu können, wurde die Denaturierungstemperatur der verschiedenen Isolate mittels dynamischer Differenzkalorimetrie in Anlehnung an die Methode von *Ahmed et al. (2006)* bestimmt. Hierfür wurden 10%ige und 15%ige Proteinlösungen mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Anschließend wurden ca. 12 bis 15 mg der Lösungen in die DSC-Tiegel (TZero Aluminium Pans) pipettiert und verschlossen. Das Denaturierungsverhalten der Proteinisolate wurde mit einem DSC Q 2000 System von TA Instruments (New Castle, USA) ermittelt. Die Kalibrierung erfolgte mit Indium (Schmelzpunkt: 156,6 °C) und einem konstanten Stickstofffluss von 50 mL/min. Dieser wurde auch bei den Messungen der Proteinisolate eingesetzt. Das Denaturierungsverhalten der Proteinisolate wurde zwischen 30 °C und 120 °C mit einer Heizrate von 5 K/min ermittelt.

12.11 Vorbehandlung der Erbsenmehle mit Lösemitteln

12.11.1 Lösemittlextraktion

Zur Extraktion des Öls aus Erbsenmehl wurden die organischen Lösungsmittel n-Hexan, Ethanol absolut und ein azeotropes Gemisch aus Wasser, Ethanol und Hexan mit den Verhältnissen von 3% demineralisiertem Wasser, 12% Ethanol, 85% n-Hexan verwendet. Das Ziel dieser Extraktion war, das Öl sowie Ölbegleitstoffe aus dem Erbsenmehl zu entfernen, um einen nahezu fettfreien Rohstoff für die anschließende Proteinextraktion zu erhalten.

Die Entölung des Erbsenmehls wurde mithilfe einer Soxhlet-Apparatur durchgeführt (Winzer 2000 mL MS 100). Für die Entölungsversuche wurden etwa 450 g Erbsenmehl in die Extraktionshülse gefüllt und mit ca. 2 L Lösemittel aufgegeben. Alle Extraktionen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

12.11.2 Behandlung mit überkritischem CO₂

Mittels überkritischen CO₂ wurden vier Entölungsversuche von Erbsenflocken durchgeführt. Aufgrund der besseren Handhabbarkeit wurden hierfür anstelle des Erbsenmehls Flocken für die Extraktion verwendet. Diese wurden mittels Walzen aus den geschälten und gesichteten Erbsenkernen hergestellt. In Tabelle 12-7 sind die Bedingungen (Temperatur, Druck, Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln als Schleppmittel) der Entölung mit überkritischem CO₂ aufgelistet.

Tabelle 12-7: Extraktionen der Erbsenflocken mit überkritischem CO₂

Temperatur	Druck	Lösungsmittel
50 ° C	285 bar	-
50 ° C	285 bar	5% Ethanol
50 ° C	750 bar	-
50 ° C	750 bar	5% Ethanol

12.12 Durchführung der Proteinextraktionen und Fällung

Herstellung von Proteinextrakten für die isoelektrische Fällung und die Ultrafiltration

Für die Untersuchungen zur isoelektrischen Fällung der Erbsenproteine wurden 200 g Erbsenmehl in einem temperierbaren 4 L-Galsreaktor innerhalb von 5 min mittels Ankerrührer in Leitungswasser suspendiert. Dabei wurden die Parameter wie in Tabelle 12-8 dargestellt variiert. Zur pH-Wert-Einstellung wurde 1 M NaOH oder 1 M HCl verwendet. Die Suspension wurde 1 h extrahiert- Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile vom proteinhaltigen Überstand mittels Zentrifugation (3300 g, 10 min) getrennt. Der Überstand wurde mit einem Feinsieb bei 180 µm gesiebt und für die Fällung verwendet.

Für die Ultrafiltration wurde der Ansatz auf 1000 g Erbsenmehl erhöht und die Extraktion, wie oben beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 12-8: Verfahrensbedingungen für die Optimierung der Proteinextraktion aus Erbsenmehl

Versuch Nr.	Korngröße [µm]	s:l-Verhältnis	Extraktions-pH-Wert	Extraktions-T [°C]	IF pH-Wert	IF T [°C]	Durchgänge
1	500	1:5	8,5	RT	4,5	RT	2
2	500	1:8	8,5	RT	4,5	RT	2
3	500	1:10	8,5	RT	4,5	RT	2
4	500	1:15	8,5	RT	4,5	RT	2
5	500	1:10	6,5	RT	4,5	RT	2
6	500	1:10	7,0	RT	4,5	RT	2
7	500	1:10	7,5	RT	4,5	RT	2
8	500	1:10	8,0	RT	4,5	RT	2
9	500	1:10	9,0	RT	4,5	RT	2
10	500	1:10	9,5	RT	4,5	RT	2
11	750	1:10	8,5	15	4,5	RT	2
12	750	1:10	8,5	RT	4,5	RT	2
13	750	1:10	8,5	30	4,5	RT	2
14	750	1:10	8,5	40	4,5	RT	2
15	750	1:10	8,5	50	4,5	RT	2
16	750	1:10	8,5	RT	3,5	RT	2
17	750	1:10	8,5	RT	4,0	RT	2
18	750	1:10	8,5	RT	5,0	RT	2
19	750	1:10	8,5	RT	4,5	5	2
20	750	1:10	8,5	RT	4,5	10	2
21	750	1:10	8,5	RT	4,5	15	2

Proteinisolierung mittels isoelektrischer Fällung

Die im Proteinextrakt enthaltenen Globuline wurden isoelektrisch unter Zugabe von 1 M HCl gefällt. Hierzu wurde der pH-Wert unter Rühren reduziert. Die Einflussparameter sind in Abbildung 10-1 dargestellt. Anschließend wurde der Proteinquark vom Fällungsüberstand mittels Zentrifugation (3300 g, 10 min) getrennt. Das gefällte Protein wurde in Wasser re-suspendiert, neutralisiert und anschließend sprühgetrocknet.

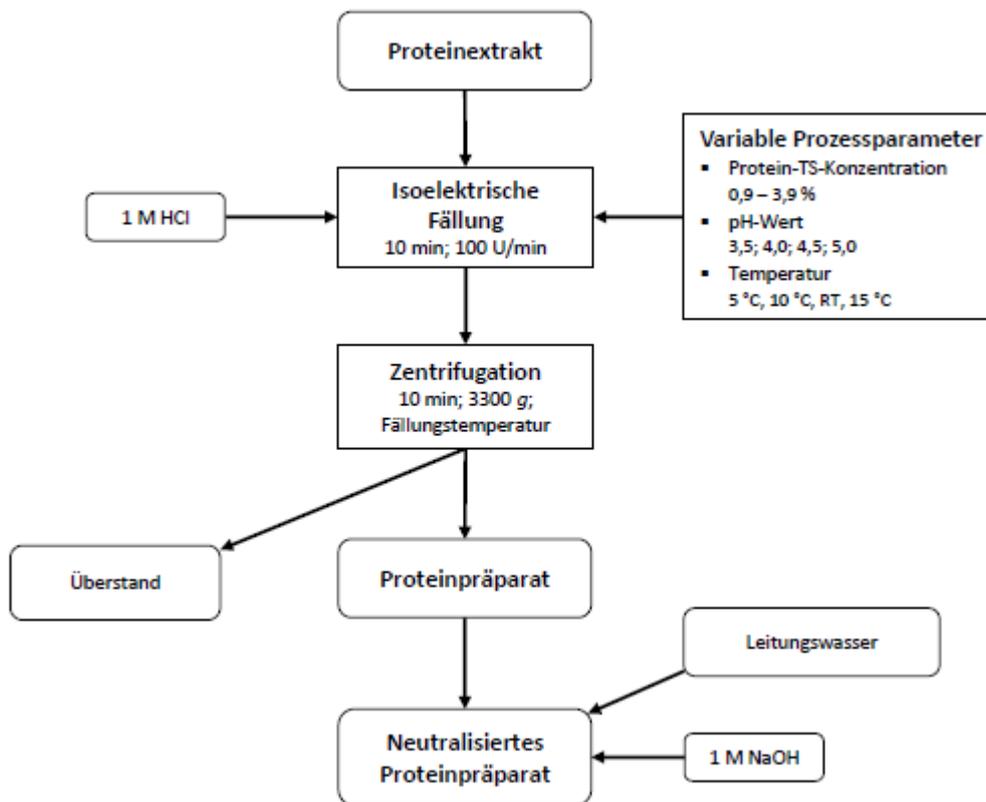


Abbildung 12-2: Verfahrensschema und Einflussfaktoren auf die isoelektrische Fällung der Erbsenproteine

Proteinisolierung mittels Ultrafiltration

Für die Ultrafiltration wurde der gewonnene Proteinextrakt in einer Mini-Ultrafiltrationsanlage mit einer 10 kDa-Membran (Pall Corporation) mit einer Filtrationsfläche von 0,1 m² aufkonzentriert. Hierzu wurde der pH-Wert des Extrakts auf pH 6,0; 6,5; 7,0 und 7,5 eingestellt, auf 20 bzw. 50 °C erhitzt. Bei einem Transmembrandruck von 1 bar wurden 8000 mL Permeat abgetrennt. Der Permeatfluss wurde mittels Messzylinder kontrolliert und der mittlere Permeatfluss pro h berechnet. Das Retentat der Ultrafiltration wurde nach Abschluss der Filtration auf pH 7 eingestellt und sprühgetrocknet.

Proteinisolierung mittels Ultrafiltration/Diafiltration

Um eine weitere Verringerung des Salzgehaltes und anderer niedermolekularer Verbindungen zu erreichen, wurde einer Ultrafiltration bei pH 7,0 und 50°C mit 2 x 2 L demineralisiertem Wasser diafiltriert. Die zugegebene Menge Wasser wurde wieder vollständig als Diafiltrat bei einem Transmembrandruck von 1 bar abgezogen. Das Retentat wurde anschließend sprühgetrocknet.

Ultrafiltration mit anschließender thermischer Fällung

Für die thermische Fällung der Erbsenproteine wurde zunächst eine Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration bei pH 7,0 und 50 °C durchgeführt. Das Retentat der Ultrafiltration wurde anschließend mit demin. Wasser auf 10% TS verdünnt und für 30 min bei 95 °C unter Rühren erhitzt. Die gebildeten Proteinagglomerate wurden durch Zentrifugation (3300 g, 10 min) vom Überstand getrennt, in Wasser re-suspendiert und sprühgetrocknet.

Sprüh Trocknung der Erbsenproteine

Die flüssigen und neutralisierten Erbsenproteine wurden mit Hilfe des Büchi Mini Spray Dryers B-191 getrocknet. Im Vorfeld wurden die neutralisierten Lösungen mit Hilfe eines UltraTurrax (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) homogenisiert. Es erfolgte eine einstufige Sprüh Trocknung mit einer Lufteingangstemperatur von 175 °C und einer Luft-Ausgangstemperatur von 80 °C. Im Gleichstrom wurden die heiße Luft und das Produkt geführt. Die Pumpe wurde auf einen Stellwert von 90% eingestellt und der Entlüfter (Aspirator) wurde bei 95% betrieben. Der Flow der Düse wurde auf 500-600 l/h eingestellt. Der Druck der Druckluft betrug am Eingang 2,8 bar und der des Luftfilters -22 mbar.

Berechnung der Ausbeuten zur Charakterisierung der Verfahren

Für den Vergleich der verschiedenen Verfahren und zur Charakterisierung der Ausbeuten wurden die Proteingesamtausbeute (PGA), die Trockensubstanzausbeute (TSA), die Extraktionsausbeute (EA), die Fällungsausbeute (FA) und die Ultrafiltrationsausbeute (UFA) berechnet. PGA und TSA beziehen sich dabei auf die erzielten Ausbeuten bezogen auf das Gesamtverfahren, während die EA sich auf den Extraktionsschritt, die FA auf den Schritt der isoelektrischen Fällung und die UFA sich auf die Ultrafiltration beziehen.

$$PGA = \frac{m_{PP} \cdot TS_{PP} \cdot P_{PP}}{m_M \cdot TS_M \cdot P_M} \cdot 100 \quad (3.1)$$

$$TSA = \frac{m_{PP} \cdot TS_{PP}}{m_M \cdot TS_M} \cdot 100 \quad (3.2)$$

$$EA = \frac{(m_M \cdot TS_M \cdot P_M) - (m_R \cdot TS_R \cdot P_R)}{m_M \cdot TS_M \cdot P_M} \cdot 100 \quad (3.3)$$

$$FA = \frac{m_{PP} \cdot TS_{PP} \cdot P_{PP}}{(m_M \cdot TS_M \cdot P_M) - (m_R \cdot TS_R \cdot P_R)} \cdot 100 \quad (3.4)$$

$$UFA = \frac{m_{Re} \cdot TS_{Re} \cdot P_{Re}}{(m_M \cdot TS_M \cdot P_M) - (m_R \cdot TS_R \cdot P_R)} \cdot 100 \quad (3.5)$$

m_{pp} = Masse Proteinprodukt (g)	m_M = Masse Erbsenmehl (g)
TS_{pp} = Trockensubstanzgehalt Proteinprodukt	TS_M = Trockensubstanzgehalt Mehl
P_{pp} = Proteingehalt Proteinprodukt (%)	P_M = Proteingehalt Mehl
m_R = Masse Extraktionsrückstand	m_{Re} = Masse Retentat
TS_R = Trockensubstanzgehalt Rückstand	TS_{Re} = Trockensubstanzgehalt Retentat

P_R = Proteingehalt Rückstand P_{Re} = Proteingehalt Retentat

12.13 Fraktionierung der Sojaproteine in Reinfractionen

12.13.1 Verfahren nach Aoki et al. (1980)

Bei diesem Fraktionierungsverfahren werden die 7 S und 11 S Sojaproteine in 2 getrennten Verfahrensschritten gewonnen. Dabei werden zunächst die Globuline in Lösung gebracht und die 11 S Proteine durch kombinierte Ca- und Kältefällung präzipitiert. Anschließend wird der Fällungsüberstand zur Aufreinigung der 7 S-Proteine durch isoelektrische Fällung bei pH 4,5 verwendet. Für die Gewinnung der 11 S-Fraktion wurde eine Kältefällung eingesetzt.

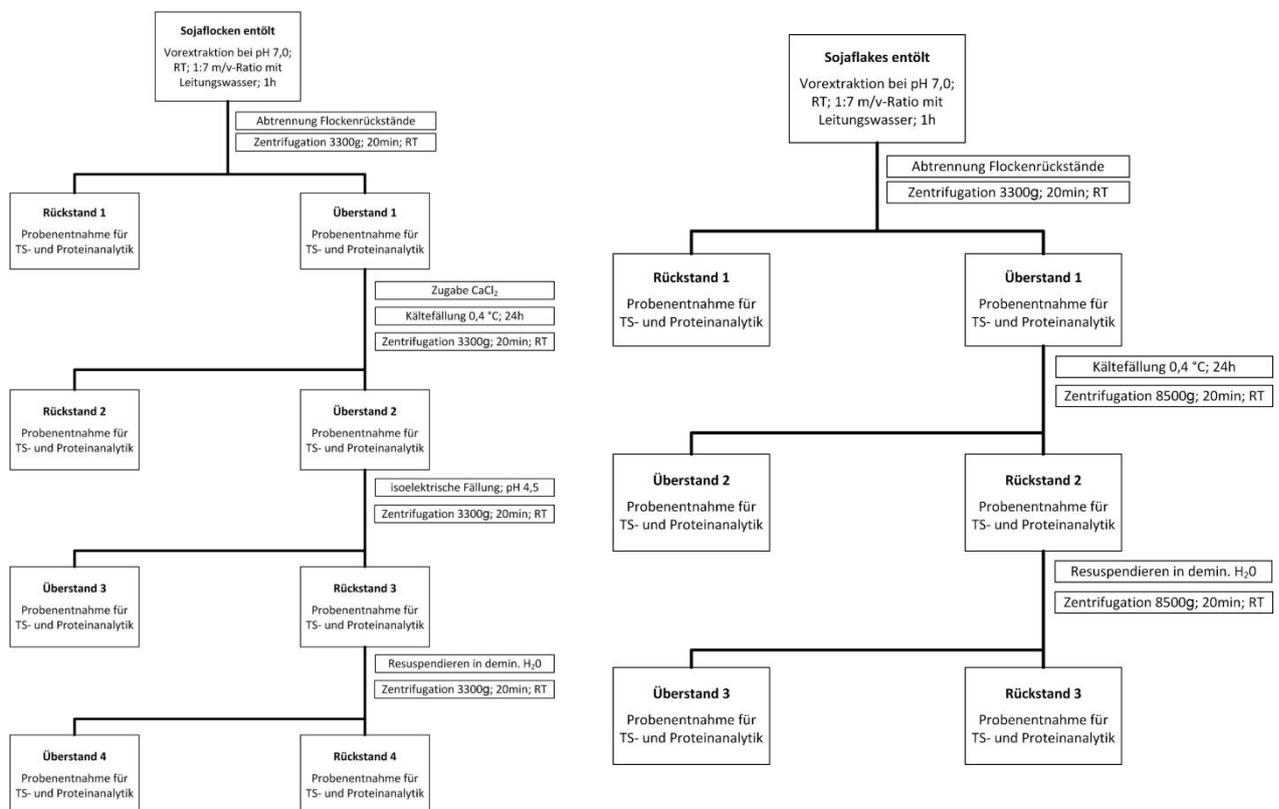


Abbildung 12-3: Verfahrensschema zur Gewinnung der 7 S (links) und der 11 S Fraktion (rechts) nach Aoki et al. (1980)

Die Zusammensetzung der Isolate und die Proteinreinheit wurden mit den beschriebenen Methoden zur Charakterisierung der Reinfractionen aus Erbse durchgeführt.

12.13.2 Verfahren nach De Souza Ferreira et al. (2010)

Das Verfahren nach De Souza Ferreira et al. (2010) ist ähnlich zum Verfahren von Aoki et al. (1980). Unterschieden sind bei den Fällungsmethoden der beiden Fraktionen zu finden. So

wurden im Verfahren nach De Souza Ferreira et al. (2010) die 11 S Proteine der Sojabohne unter einer Kombination von Natriumbisulfid (SBS) und Kälte gefällt. Die im Überstand befindlichen 7 S Proteine sollten anschließend unter Zugabe von NaCl und einem pH-Wert von 5,0 gefällt werden.

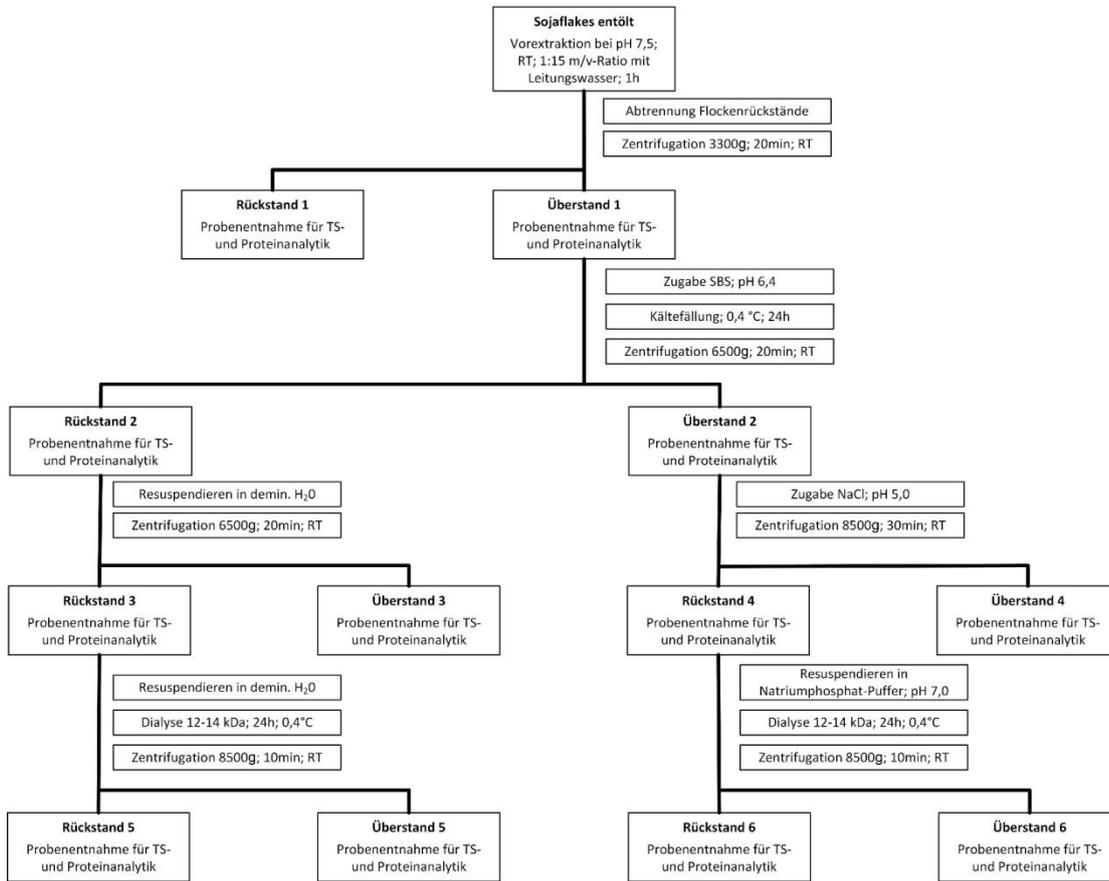


Abbildung 12-4: Fraktionierungsverfahren nach De Souza Ferreira et al. (2010)

13 Literaturverzeichnis

- Aldin, E.; Reitmeier, H. A.; Murphy, P. *Bitterness of Soy Extracts Containing Isoflavones and Saponins*. J. Food Sci. **2006**, 71 (3), S211–S215.
- AMNUAYCHEEWA, P. & DE MEJIA, E. G., 2010, Purification, characterisation and quantification of the soy allergen profilin (Gly m 3) in soy products, Food Chemistry, 119(4), 1671-1680.
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsmethoden nach § 64 LFGB, *Bestimmung der Geschmacksempfindlichkeit (nach DIN ISO 3972)*, Beuth Verlag GmbH, Berlin, L 00.90-9, **2014**
- AOKI, H., TANEYAMA, O., INAMNI, M., 1980, Emulsifying Properties of Soy Protein: Characteristics of 7S and 11S Proteins, Journal of Food Science, 45, 534-546.
- Arai, S.; Suzuki, H.; Fujimaki, M. *Studies on Flavor Components in Soybean Part II*. Agric. Biol. Chem. **1966**, 30 (4), 364–369.
- Belitz, H-D., Grosch, W., Schieberle, P. (Eds.): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer, Berlin, 6. Aufl., **2007**, 193-203
- Busch-Stockfisch, M. *Praxishandbuch Sensorik in der Produktentwicklung und Qualitätssicherung*. Behr's... Verlag, Hamburg, **2007**, Anhang 1
- CHERRY, J.P. (Hrsg.), 1981, Protein Functionality in Foods, American Chemical Society, Washington D.C.
- Degenhardt, A. G. *Strukturchemische und sensorische Charakterisierung von Guaiansesquiterpenlactonen in Chicorée (Cichorium intybus L. var. Foliosum Hegi) und C₁₇₋₂₁-Oxylipinen in Avocado (Persea americana Mill. cv. Hass)*, Dissertation, Technische Universität München, **2012**
- Fang, N.; Yu, S.; Badger, T. M. *Comprehensive Phytochemical Profile of Soy Protein Isolate*. J. Agric. Food Chem. **2004**, 52 (12), 4012–4020.
- FAO. *Livestock's Long Shadow - Environmental Issues and Options*. FAO **2006**, 112–114.
- Frank, O.; Jezusek, M.; Hofmann, T. *Characterisation of novel 1 H ,4 H -quinolizinium-7-olate chromophores by application of colour dilution analysis and high-speed countercurrent chromatography on thermally browned pentose/ L -alanine solutions*. Eur. Food Res. Technol. **2001**, 213 (1), 1–7.
- Friebolin, H. *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie - eine Einführung*. WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 3. Auflage, **1999**, 34-35, 256-257, 219-220, 265, 270
- Günther-Jordanland, K. *Persönliche Mitteilung*. **2017**
- Heng, L. *Flavour Aspects of Pea and its Protein Preparations in Relation to Novel Protein Foods*, Ph.D. Thesis Wageningen University, **2005**
- Heng, L.; Vincken, J.-P.; van Koningsveld, G.; Legger, A.; Gruppen, H.; van Boekel, T.; Roozen, J.; Voragen, F. *Bitterness of saponins and their content in dry peas*. J. Sci. Food Agric. **2006**, 86 (8), 1225–1231.

- Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Thieme Verlag, Stuttgart, 7. Auflage, **2005**, 120, 144-145, 152-154, 187-192
- Hostettmann, K.; Marston, A. *Saponins* Cambridge University Press, **1995**, 1-2
- Jin, A. (Lihua); Ozga, J. A.; Lopes-Lutz, D.; Schieber, A.; Reinecke, D. M. *Characterization of proanthocyanidins in pea (*Pisum sativum* L.), lentil (*Lens culinaris* L.), and faba bean (*Vicia faba* L.) seeds*. Food Res. Int. **2012**, 46 (2), 528–535.
- GARCÍA, M. C., TORRE, M., MARINA, M. L., LABORDA, F., 1997, Composition and characterization of soybean and related products, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 37, 4, 361-391.
- Kitagawa, I.; Taniyama, T.; Nagahama, Y.; Okubo, K.; Yamauchi, F.; Yoshikawa, M. *Saponin and sapogenol. XLII. Structures of acetyl-soyasaponins A1, A2, and A3, astringent partially acetylated bisdesmosides of soyasapogenol A, from american soybean, the seeds of *Glycine max* MERRILL*. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). **1988**, 36 (8), 2819–2828.
- Kudou, S.; Fleury, Y.; Welti, D.; Magnolato, D.; Uchida, T.; Kitamura, K.; Okubo, K. *Malonyl Isoflavone Glycosides in Soybean Seeds (*Glycine max* MERRILL)*. Agric. Biol. Chem. **1991**, 55 (9), 2227–2233.
- Lainer, J. *Klärung der Ursache eines Off-Flavours bei Mohnsamen und Erarbeitung von Parametern für die Rohstoffkontrolle*. AiF-Schlussbericht 16297 N, **2014**
- LIU, K., 1997, *Soybeans. Chemistry, Technology and Utilization*, Chapman & Hall, New York, 1. Auflage.
- Matsuura, M.; Obata, A. *β -Glucosidases from Soybeans Hydrolyze Daidzin and Genistin*. J. Food Sci. **1993**, 58 (1), 144–147.
- Matsuura, M.; Obata, A.; Fukushima, D. *Objectionable Flavor of Soy Milk Developed during the Soaking of Soybeans and its Control*. J. Food Sci. **1989**, 54 (3), 602–605.
- Meister, S. *Molekulare Charakterisierung von Bitterstoffen in Erbsenproteinisolationen*, Master's Thesis, Technische Universität München, **2018**
- Mittermeier, V. *Persönliche Mitteilung*. **2017**
- Murphy, R.C. *Tandem Mass Spectrometry of Lipids – Molecular Analysis of Complex Lipids*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2015**, 19-22
- Naczki, M.; Amarowicz, R.; Sullivan, A.; Shahidi, F. *Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review*. Food Chem. **1998**, 62 (4), 489–502.
- Nazareth, Z. M. *Compositional, functional and sensory properties of protein ingredients*. **2009**.
- Nyberg, N. T.; Duus, J. Ø.; Sørensen, O. W. *Heteronuclear Two-Bond Correlation: Suppressing Heteronuclear Three-Bond or Higher NMR Correlations while Enhancing Two-Bond Correlations Even for Vanishing 2 J_{CH}*. J. Am. Chem. Soc. **2005**, 127 (17), 6154–6155.
- Okubo, K.; Iijima, M.; Kobayashi, Y.; Yoshikoshi, M.; Uchida, T.; Kudou, S. *Components Responsible for the Undesirable Taste of Soybean Seeds*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **1992**, 56 (1), 99–103.

- Price, K. R.; Fenwick, G. R. *Soyasaponin I, a Compound Possessing Undesirable Taste Characteristics Isolated from the Dried Pea (Pisum sativum L.)*. **1984**, 35 (8), 887–892.
- Price, K. R.; Griffiths, N. M.; Curl, C. L.; Fenwick, G. R. *Undesirable sensory properties of the dried pea (Pisum sativum). The rôle of saponins*. Food Chem. **1985**, 17, 105–115.
- Rackis, J. J.; Sessa, D. J.; Honig, D. H. *Flavor problems of vegetable food proteins*. J. Am. Oil Chem. Soc. **1979**, 56 (3), 262–271.
- Reim, V.; Rohn, S. *Characterization of saponins in peas (Pisum sativum L.) by HPTLC coupled to mass spectrometry and a hemolysis assay*. Food Res. Int. **2015**, 76, 3–10.
- Sengbusch, R. v. *Die Prüfung des Geschmacks und der Giftigkeit von Lupinen und anderen Leguminosen durch Tierversuche unter besonderer Berücksichtigung der züchterisch brauchbaren Methoden*. Der Züchter. **1934**, 6, 62-72
- Sessa, D. J.; Warner, K.; Honig, D. H. *Soybean Phosphatidylcholine develops bitter Taste on Autoxidation*. J. Food Sci. **1974**, 39 (1), 69–72.
- DE SOUZA FERREIRA, E., et al., *β -Conglycinin (7S) and glycinin (11S) exert a hypocholesterolemic effect comparable to that of fenofibrate in rats fed a high-cholesterol diet*. Journal of Functional Foods, 2010. 2: p. 275-283.
- THANH, V. H., SHIBASAKI, K., 1976. Major Proteins of Soybean Seeds, A Straightforward Fractionation and Their Characterization, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 24, 1117-1121
- Tsunoda, Y.; Okawa, M.; Kinjo, J.; Ikeda, T.; Nohara, T. *Studies on the Constituents of Gueldenstaedtia multiflora*. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). **2008**, 56 (8), 1138–1142.
- Wieser, H.; Belitz, H.-D. *Zusammenhänge zwischen Struktur und Bittergeschmack bei Aminosäuren und Peptiden*. Z. Lebensm. Unters. Forsch. **1975**, 159 (2), 65–72.

14 Dokumentation

14.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den Zielsetzungen des Antrages

Obwohl die Nutzung pflanzlicher Proteinkonzentrate/-isolate als Emulgatoren, Schaumbildner oder Wasserbinder in diversen Nahrungsmitteln, im Vergleich zu tierischen Proteinen, nachhaltig sowie wirtschaftlich und ethisch attraktiv ist, ist deren Einsatz in der deutschen Lebensmittelindustrie aufgrund ihrer unerwünschten organoleptischen Eigenschaften noch stark unterentwickelt. So weisen pflanzliche Proteinkonzentrate/-isolate oftmals einen langanhaltenden bitter-adstringierenden Fehlgeschmack auf.

Die geschmackliche Optimierung von derzeit kommerziell erhältlichen bzw. die Entwicklung einer neuen Generation an sensorisch attraktiven Proteinisolaten, die aus pflanzlichen Quellen, wie z.B. Raps, Soja und Erbsen stammen, stellt das Ziel des vorliegenden Forschungsvorhabens dar. Dabei sollen Kenntnisse über den intrinsischen Geschmack der gereinigten Proteine sowie über den bitter-adstringierenden Fehlgeschmack der strukturell identifizierten und sensorisch charakterisierten anhaftenden Nebenbestandteile wissensbasierte verfahrenstechnische Optimierungsstrategien zur Entfernung bzw. Abreicherung dieser Verbindungen ermöglichen. Um die industrielle Umsetzung der erarbeiteten Erkenntnisse vorzubereiten, sollen die zunächst im Labormaßstab optimierten Herstellungsprozesse in den Technikumsmaßstab übertragen werden. Durch die Entwicklung von fehlgeschmacksreduzierten Raps-, Erbsen- und Soja-Proteinisolaten sollen neue Applikationsmöglichkeiten in sensiblen, geschmacksneutralen bzw. hochprotein-haltigen Lebensmittelsystemen eröffnet und evaluiert werden.

1.1. Teilziel/Arbeitspaket 1: *Sensorische und technofunktionelle Charakterisierung von kommerziellen Protein-Präparaten (FS1/FS2)*

- Verwendung der Zuwendung: **Forschungsstelle 1**
 - Durchgeführte Arbeiten

Das an FS 1 vorhandene Sensorikpanel wurde hinsichtlich der sensorischen Analyse von Proteinisolaten geschult. Im Anschluss daran wurden die von den Mitgliedern des projektbegleitenden Ausschusses zur Verfügung gestellte Erbsen und Soja-Proben sensorisch untersucht. Im weiteren Projektverlauf erfolgt nicht nur die organoleptische Beurteilung von Rapsproteinisolaten sondern auch von weiteren Proben der beteiligten Industriepartner. Um die Varianz im Gehalt der Fehlgeschmackskomponenten aufgrund von Ernte- und Umwelteinflüssen zu untersuchen, werden nach dem 1. und 2. Projektjahr weitere Proteinisolate der ausgewählten Hersteller bezogen und untersucht.

- **Erzielte Ergebnisse**

Nach erfolgter Schulung konnte das an FS1 vorhandene Sensorikpanel den bitteren-adstringierenden Fehlgeschmack von Proteinisolaten sicher detektieren und auch Proben hinsichtlich der Intensität bewerten. Sowohl die Proteinisolate von Erbse als auch die von Soja weisen alle einen, vom pH-Wert der Matrix unabhängigen, bitter-adstringierenden Geschmackseindruck auf.

- **Verwendung der Zuwendung: Forschungsstelle 2**

- **Durchgeführte Arbeiten**

An FS 2 wurden die zur Verfügung gestellten Raps-, Erbsen- und Sojaproteinisolate hinsichtlich ihrer Partikelgrößenverteilung, ihrer funktionellen Eigenschaften (Proteinlöslichkeit, Emulgierverhalten) sowie ihres thermischen Verhaltens mittels DSC (Differential Scanning Calorimetry) untersucht.

- **Erzielte Ergebnisse**

Die untersuchten Proteinisolate aus Erbse, Soja oder Raps hatten unterschiedliche Partikelgrößenverteilung. Herausstechend waren die Partikelgrößen des Erbsenproteinisolats der Firma Emsland. Diese hatten die größten Partikel aller untersuchten Muster. Die am IVV hergestellten Produkte aus dem Pilotmaßstab hatten die kleinsten Partikelgrößen. Alle anderen Isolate wiesen Partikelgrößen für $D_{0,9}$ im Bereich von 90 bis 200 μm auf. Auch bei den funktionellen Eigenschaften der Proteinisolate zeigten sich deutliche Unterschiede. So wiesen die kommerziellen Erbsenproteinisolate eine geringe Löslichkeit von $< 20\%$ über den gesamten pH-Bereich auf. Die Sojaisolate hatten den typischen U-förmigen Proteinlöslichkeitsverlauf mit einem Löslichkeitsminimum zwischen pH 4 und pH 5. Sie wiesen schlechte bis mittlere Proteinlöslichkeiten von $< 20\%$ bis hin zu 50% bei pH 7 auf. Alle untersuchten Rapsproteinisolate besaßen Proteinlöslichkeiten zwischen 80 und 90% über den gesamten untersuchten pH-Bereich. Diese Unterschiede sind auf unterschiedliche Herstellverfahren und unterschiedliche Proteinzusammensetzungen zurückzuführen.

1.2. Teilziel/Arbeitspaket 2: *Gewinnung hochreiner Proteinfractionen im Labormaßstab (FS1/FS2)*

Verwendung der Zuwendung: **Forschungsstelle 2**

- **Durchgeführte Arbeiten**

Die Arbeiten zur Gewinnung hochreiner Proteinfractionen aus Erbse, Raps und Soja wurden an FS 2 durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die in der Literatur beschriebenen Methoden häufig die Anforderung an die Gewinnung einzelner

Proteinfractionen zwar erfüllen, dass die Proteingehalte dieser Fraktionen jedoch häufig < 50% sind. Diese sind für die Bewertung der sensorischen Eigenschaften nicht geeignet. Daher mussten neue Herangehensweisen erarbeitet werden. Diese umfangreichen Arbeiten konnten für Soja teilweise und für Erbse erfolgreich abgeschlossen werden. Für die Fraktionierung von Rapsproteinen war eine Aufreinigung nicht möglich.

- Erzielte Ergebnisse:

Für die Gewinnung von Reifractionen aus Erbsen wurden an FS 2 Verfahren etabliert, die eine Herstellung von Erbsenalbuminen, Erbsenglobulinen, sowie Legumin-angereicherter als auch Vicillin- und Convicillin-angereicherter Fraktionen erlauben. Für Soja konnte ebenfalls ein vielversprechendes Verfahren für die Anreicherung von Glycinin erreicht werden. Eine Anreicherung von β -Conglycinin war nicht erfolgreich. Bei Raps konnte mit den bestehenden und adaptierten Methoden keine zufriedenstellende Abreicherung an sekundären Pflanzenstoffen sowie Anreicherung von Napin oder Cruciferin erreicht werden.

1.3. Teilziel/Arbeitspaket 3: *Aktivitätsorientierte Fraktionierung und Identifizierung der Fehlgeschmackstoffe in Proteinpräparaten (FS 1)*

Verwendung der Zuwendung: **Forschungsstelle 1**

- Durchgeführte Arbeiten

Um jeweiligen nicht-kovalent anhaftenden, bitter-adstringierenden Nebenbestandteile der drei pflanzlichen Proteinisolate zu identifizieren, wurden die Erbsen- und Sojaproteinisolate bereits aktivitätsorientiert (nach dem SENSOMICS-Konzept) fraktioniert. Die einzelnen Extrakte wurden sowohl mittels UPLC-TOF-MS-Techniken als auch mittels sensorischer Tests näher charakterisiert. Auf diese Weise wurde die geschmacklich potenteste Fraktion aus Erbsenproteinisolaten für weitere Fraktionierungsschritte mittels MPLC-ELSD/GVA herangezogen. So konnten abermals weniger beziehungsweise nicht geschmacksaktive Komponenten abgereichert werden. Anschließend wurde diese Fraktion zur weiteren Aufreinigung mit einer präparativen HPLC-ELSD-Methode subfraktioniert. Nach anschließender GVA konnten so die Bitterstoffe auch in den HPLC-Fractionen lokalisiert werden. Für die bitteren HPLC-Fractionen konnten nun weitere Trennmethoden im semipräparativen Maßstab entwickelt werden. Mittels NMR-Spektroskopie und massenspektrometrischer Verfahren konnten so die Strukturen der Bitterstoffe aufgeklärt werden. Des Weiteren wurden die Geschmacksschwellenwerte von nicht literaturbekannten Bitterstoffen durch ein trainiertes Sensorikpanel bestimmt.

- Erzielte Ergebnisse

Verkostungen des sensorisch geschulten Sensorikpanels ergaben, dass nichtflüchtige, niedermolekulare, bitter-adstringierende Verbindungen vom Protein mittels Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität abgetrennt werden können. Für Erbsenproteinisolate wurde dafür ein Gemisch aus Methanol und Wasser (1+1/v+v) als Extraktionsmittel verwendet. Mittels MPLC-ELSD konnte dieser Extrakt in dreizehn Fraktionen aufgereinigt werden. In Fraktion 10 konnten mittels UPLC-TOF-MS-Methoden Hinweise auf die Existenz von Soyasaponin I gefunden werden. Nach einer anschließenden Geschmacksverdünnungsanalyse der Fraktionen konnte aber der Einfluss dieses literaturbekannten Bitterstoffes zum Fehlgeschmack des Isolats als gering eingestuft werden. Die geschmacklich aktivste Fraktion 11 wurde weiter mittels einer präparativen HPLC-ELSD-Methode subfraktioniert. Auf diese Weise wurden weitere 17 Subfraktionen gewonnen. Durch UPLC-ToF-MS-Techniken konnten in den unpolaren Fraktionen Hinweise auf die Existenz von Lipidoxidationsprodukten gewonnen werden. Durch Vergleich mit Literaturdaten und Referenzsubstanzen konnten diese als Hydroxyoctadecadiensäuren, Oxo-octadecadiensäuren und 9,10,13-Trihydroxy-octadec-10-ensäure ausgemacht werden. Bislang wurden Fraktion 17 und 16 final mittels semipräparativer HPLC-Methoden aufgetrennt und die isolierten Verbindungen strukturell aufgeklärt. So kann aus dem NMR der Hauptsubstanz in Fraktion I-11-18 auf die Existenz der nicht literaturbekannten Substanz 6,9,19,22-Octacosatetraen geschlossen werden und die Struktur dieser postuliert werden. Fraktion I-11-17 bestand wiederum aus 6 Peaks. Diese konnten zunächst als Linolsäure, Linolensäure, 1-Linoleoylglycerol, 2-Hydroxypalmitinsäure und 2-Hydroxyölsäure identifiziert werden. Weiterhin coeluierte in dieser Fraktion ein Gemisch aus Hydroxyoctadecadiensäuren. Diese konnten mittels NMR- und UPLC-ToF-MS-Techniken, sowie durch Vergleich mit kommerziellen Standards, als 9-HODE (cis, trans), 9-HODE (trans, trans) und 13-HODE unterschieden werden. 2-Hydroxypalmitinsäure und 2-Hydroxyölsäure wurden weiterhin sensorisch charakterisiert. So wurden humane Bitterschwellenwerte von 0,22 µmol/l für 2-Hydroxypalmitinsäure und 0,06 µmol/l für 2-Hydroxyölsäure bestimmt. Zukünftig sollen alle weiteren Bitterstoffe isoliert und deren Struktur aufgeklärt werden. Des Weiteren konnten im Methanol/Wasser-Extrakt (7+3/v+v) aus Sojaproteinisolaten Fragmentierungsmuster und Elementarzusammensetzungen der literaturbekannten Bitterstoffe und Adstringenzen Genistein, Genistin, Daidzein und Soyasaponin I mittels UPLC-ToF-MS-Methoden ermittelt werden. Deren Beitrag zum Fehlgeschmack von

Sojaproteinisolaten soll zukünftig mittels weiterer sensorischer Methoden ermittelt werden.

1.4. Teilziel/Arbeitspaket 6: *Optimierung der Herstellung von Fehlgeschmacksreduzierten Proteinisolaten (FS1/FS2)*

Verwendung der Zuwendung: **Forschungsstelle 1/2**

▪ Durchgeführte Arbeiten

An Forschungsstelle 2 wurden umfangreiche Arbeiten zur Optimierung fehlgeschmacksreduzierter Proteinisolate aus Erbse durchgeführt. Hierbei wurden die Erbsen zunächst unterschiedlich vorbehandelt. Anschließend wurden die Extraktionsparameter während der wässrigen Extraktion optimiert und verschiedene Konzentrierungsmethoden und deren Auswirkung auf die Ausbeute, die funktionellen und thermischen Eigenschaften untersucht. Die sensorische Charakterisierung erfolgte an **FS1** für ausgewählte Isolate.

▪ Erzielte Ergebnisse

Im Rahmen dieses Arbeitspakets wurden Untersuchungen zur Vorbehandlung von Erbsenmehl zur Verringerung der bitter-adstringierenden Fehlgeschmacksstoffe durchgeführt. Hierfür wurde Erbsenmehl mit unterschiedlichen Lösemitteln und überkritischem CO₂ behandelt und aus den behandelten Erbsenmehlen Proteinisolate hergestellt. Zudem wurde eine thermische Enzyminaktivierung der Erbsen durchgeführt. Die Lösemittelbehandlungen erwiesen sich in diesen Versuchsreihen als nicht erfolgreich, da zwar Öl und Ölbegleitstoffe aus den Erbsen entfernt werden konnten, wodurch die Farbe der Isolate verbessert wurde. Die sensorischen Eigenschaften der vorbehandelten Erbsenisolate verschlechterten sich jedoch, so dass verstärkt bitter-adstringierende Fehlgeschmäcker auftraten. Dies könnte an einem maskierenden Effekt anderer Fettbegleitstoffe liegen. Die thermische Enzyminaktivierung verbesserte zwar die Sensorik der Isolate, führte aber gleichzeitig zu Ausbeuteeinbußen, weshalb hier die Wirtschaftlichkeit der Verfahren nicht mehr gegeben sein könnte.

Die Optimierung der Extraktions- und Konzentrierungsbedingungen hingegen erwies sich sowohl in Bezug auf Ausbeute, Funktionalität als auch Sensorik als vielversprechende Möglichkeit der Einflussnahme. Durch Optimierung konnten die idealen Verfahrensbedingungen ermittelt werden.

1.5. Teilziel/Arbeitspaket 7: *Übertragung des Verfahrens in den Technikumsmaßstab (Scale-up) (FS 2)*

Verwendung der Zuwendung: **Forschungsstelle 2**

- Durchgeführte Arbeiten:

An FS 2 wurden die beiden vielversprechendsten Verfahren aus dem Labormaßstab in den Technikumsmaßstab übertragen, um die Übertragbarkeit zu prüfen, ausreichend Material für die Abschätzung des Anwendungspotentials bereitzustellen sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Hierfür wurden 2 Technikumläufe mit jeweils 200 kg Inputmaterial (Erbsenmehl) durchgeführt. Die Produkte wurden pasteurisiert (72 °C, 3 min) und anschließend bei 180 °C Lufteingangstemperatur und 80 °C Luftausgangstemperatur sprühgetrocknet.

- Erzielte Ergebnisse:

Die Übertragung der Verfahren in den Technikumsmaßstab verlief ohne Schwierigkeiten. Es konnte Produkte mit vergleichbaren funktionellen und sensorischen Eigenschaften wie im Labormaßstab hergestellt werden. In beiden Technikumsversuchen wurden jeweils ca. 20 kg Erbsenproteinisolat hergestellt.

1.6. Teilziel/Arbeitspaket 8: Applikationsstudien mit optimierten Proteinisolaten (FS 2)

Verwendung der Zuwendung: **Forschungsstelle 2**

- Durchgeführte Arbeiten:

An FS 2 wurden Produktmuster mit kommerziell verfügbaren Erbsenproteinisolaten und den optimierten Proteinisolaten hergestellt und sensorisch bewertet.

- Erzielte Ergebnisse:

Die bereits mit den optimierten Proteinisolaten erzielten positiven sensorischen Ergebnisse ließen sich auch in Produkten mit Proteingehalten > 3% nachweisen. Bei kleineren Einsatzmengen konnten hingegen keine positiven und negativen Effekte nachgewiesen werden.

1.7. Teilziel/Arbeitspaket 10: Projektmanagement, Projektmeetings, Erstellung von Zwischen- und Abschlussberichten (FS1/FS2)

Verwendung der Zuwendung: **Forschungsstelle 1/2**

- Durchgeführte Arbeiten

Im Rahmen des Vorhabens wurden insgesamt 5 Projektmeetings zusammen mit dem Projektbegleitenden Ausschuss durchgeführt, in denen die Ergebnisse und der Projektfortschritt diskutiert wurden. Zudem trafen sich die beiden Forschungsstellen bilateral zum Austausch ihrer Ergebnisse.

Ebenso wurden während der Projektlaufzeit 3 gemeinsame Zwischenberichte sowie ein Abschlussbericht erstellt.

14.2 Angaben zum zahlenmäßigen Nachweis

Forschungsstelle 1

- wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)

A.1	Gem. Einzelfinanzierungsplan	2015	2016	2017	2018	kumuliert
- HPA A	30	3	12	12	3,5	30,5*

* Die Überschreitung der bewilligten Personenmonate wurde angezeigt und mit AiF-Schreiben vom 17.08.2017 zur Kenntnis genommen

- Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans): -/-
- Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans): -/-

Forschungsstelle 2

- wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplans)

A.1	Gem. Einzelfinanzierungsplan	2015	2016	2017	2018	kumuliert
- HPA A/B	29	5,43	8,48	10,87	3,59	28,37

- Geräte (Einzelansatz B des Finanzierungsplans) – nicht beantragt und bewilligt.
- Leistungen Dritter (Einzelansatz C des Finanzierungsplans) – nicht beantragt und bewilligt.

14.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Forschungsstelle 1

Die geleistete Arbeit entspricht in vollem Umfang dem begutachteten und bewilligten Antrag und war daher für die Durchführung des Vorhabens notwendig und angemessen. Der wissenschaftliche Mitarbeiter war hierbei federführend für das Training des Sensorikpanels verantwortlich und erstellte die Fraktionierungsstrategie zur Isolierung der Schlüsselgeschmacksstoffe. Bei den aufwendigen und zeitintensiven Extraktionsarbeiten der Proteinisolate war zusätzlich die Unterstützung durch einen chemisch-technischen Angestellten erforderlich.

Forschungsstelle 2

Die geleistete Arbeit entspricht in vollem Umfang dem begutachteten und bewilligten Antrag und war daher für die Durchführung des Vorhabens notwendig und angemessen. Der wissenschaftliche Mitarbeiter war dabei federführend für die Koordination der Analysen und die Auswertung der Ergebnisse verantwortlich und erstellte die Fraktionierungsstrategie zur Gewinnung hochreiner Proteinfractionen aus Soja, Raps und Erbse sowie die Optimierungsstrategie zur Gewinnung fehlgeschmacksreduzierter Proteinisolate. Zudem war er für die Planung, Durchführung und Dokumentation des Scale-up und der Anwendungsversuche verantwortlich. Zusätzlich wurden umfangreiche Laborarbeiten vom technischen Personal an FS 2 durchgeführt.

14.4 Plan zum Ergebnistransfer

Informationen zu den Inhalten und Ergebnissen des Projektes werden seitens des FEI und seitens der Forschungsstelle bereits während der Vorhabenlaufzeit sowie nach Vorhabenabschluss über folgende Maßnahmen und Wege transferiert, um eine breitenwirksame Nutzung der Ergebnisse in der Wirtschaft sicherzustellen*):

* Vom FEI veranlasste Maßnahmen / Zeitplan bei Projektstart 01.09.2015

** *Von Forschungsstelle(n) auszufüllen bzw. zu veranlassen*

1. Transfermaßnahmen des FEI	geplant	durchgeführt
<ul style="list-style-type: none"> Einstellung von Projektinformationen auf der FEI-Website* und in die öffentlich zugängliche FEI-Internet-Projektdatenbank* 	1. Quartal 2016* mit jährlichen Aktualisierungen	1. Quartal 2016* mit jährlichen Aktualisierungen
<ul style="list-style-type: none"> Jährliche Veröffentlichung (jeweils im 1. Quartal) von Projektinformationen im FEI-Forschungsreport* und im FEI-Jahresbericht* 	1. Quartal 2016* 1. Quartal 2017* 1. Quartal 2018*	1. Quartal 2016* 1. Quartal 2017* 1. Quartal 2018*
<ul style="list-style-type: none"> Jährliche Veröffentlichung (jeweils im 1. Quartal) von FEI-Projektkurzberichten* und FEI-Projektdokumentationen* 	1. Quartal 2016* 1. Quartal 2017* 1. Quartal 2018*	1. Quartal 2016* 1. Quartal 2017* 1. Quartal 2018*
<ul style="list-style-type: none"> Vorstellung der Ergebnisse im Rahmen der FEI-Jahrestagungen* 	ab 2018*	
<ul style="list-style-type: none"> Einbeziehung bzw. Beteiligung des folgenden Branchenfachverbands bzw. FEI-Mitgliedsverbands als Informationsmultiplikator gegenüber der potenziellen Nutzergruppe (u.a. mit Projektberichterstattung in Gremien- und Arbeitskreissitzungen des Verbands): Union zur Förderung von Öl- und Proteinpflanzen e. V. (UFOP) 	1. Quartal 2016* 1. Quartal 2017* 1. Quartal 2018*	1. Quartal 2016* 1. Quartal 2017* 1. Quartal 2018*

<ul style="list-style-type: none"> Erstellung ausführlicher (kalenderjährlicher) Projekt(zwischen)-berichte und jährliche Weitergabe dieser Berichte* (jeweils im 1. Quartal) über den <u>o.g.</u> Branchenfachverband an alle interessierten Unternehmen* 	<p>1. Quartal 2016*</p> <p>1. Quartal 2017*</p> <p>1. Quartal 2018*</p>	<p>1. Quartal 2016*</p> <p>1. Quartal 2017*</p> <p>1. Quartal 2018*</p>
<ul style="list-style-type: none"> Dauerhafte Bereitstellung aller relevanten Projektinformationen, Berichte und Sitzungsprotokolle für den beteiligten Branchenverband sowie die Unternehmen des Projektbegleitenden Ausschusses über den „FEI-Service“ (FEI-Extranet)* 	<p>ab</p> <p>Laufzeitbeginn*</p>	<p>ab</p> <p>Laufzeitbeginn*</p>
<ul style="list-style-type: none"> Regelmäßige (mind. 1x jährliche) Sitzungen des Projektbegleitenden Ausschusses (PA) des FEI und kontinuierliche Berichterstattung gegenüber den hierin vertretenen Unternehmen und Verbänden* 	<p>30.06.2016</p>	<p>30.06.2016</p> <p>16.02.2017</p> <p>05.07.2017</p> <p>07.02.2018</p>

2. Transfermaßnahmen der Forschungsstelle(n)	geplant	durchgeführt
<ul style="list-style-type: none"> Publikation der Ergebnisse in folgenden wissenschaftlichen Fachzeitschriften bzw. Branchenzeitschriften während der Laufzeit sowie spätestens innerhalb von 6 Monaten nach Vorhabenabschluss: <ul style="list-style-type: none"> Food Chemistry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, LWT Food Science and Technology, Journal of Food Engineering, u.a Vorläufiger Titel: "Molecularization of bitter off-flavor compounds in pea protein isolates" (FS1) Dissertation "Molekulare Charakterisierung der Fehlgeschmacksstoffe in Erbsenproteinisolaten" <ul style="list-style-type: none"> Lebensmitteltechnik, New Food Magazine, u.a. vorläufiger Titel: „Influence of different extraction and concentration procedures on pea protein functionality“ (FS 2) 	<p>Ende 2018</p> <p>Für 2019 geplant</p> <p>Ende 2018</p>	
<ul style="list-style-type: none"> Vorstellung der Ergebnisse (durch Vorträge & Posterpräsentationen) <p><u>Vorträge bei der Union zur Förderung von Öl- und Proteinpflanzen e. V. (UFOP):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Dawid, C.; Gläser, P.; Mittermaier, S.; Eisner, P.; Hofmann, T. Sitzung der UFOP-Fachkommission „Humanernährung“, Berlin, Deutschland: Clarification of the reasons for bitter and astringent Off-flavors in plant protein isolates and development of technological parameters for quality improvement. 		<p>28.10.2016</p>

<ul style="list-style-type: none"> - Dawid, C.; Gläser, P.; Mittermaier, S.; Eisner, P.; Hofmann, T. Gemeinsame Sitzung der UFOP-Fachkommissionen „Rapsöl“ und „Humanernährung“, Berlin, Deutschland: Bitter-astringent off-taste of pea protein isolates - characterization of the key components and technological strategies for their removal or decimation 		25.10.2017
<p><u>Vortrag bei IVLV Arbeitsgruppentreffen</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Dawid, C.; Gläser, P.; Mittermaier, S.; Eisner, P.; Hofmann, T. IVLV Arbeitsgruppentreffen, Freisinger Tage: Pflanzliche Lebensmittelproteine, Freising, Deutschland, 12. –13.04.2018: Ursachen des bitteradstringierenden Fehlgeschmacks von pflanzlichen Proteinen, Möglichkeiten zur Qualitätsverbesserung. 		12.04.2018
<p><u>Vorträge geplant auf folgenden Veranstaltungen:</u></p>		
<p>Hochschulöffentlicher Vortrag im Forschungsseminar für Lebensmittelchemie</p>	Okt. 2018	
<p>Beitrag auf dem Wartburgsymposium für Flavor Chemistry and Biology</p>	Mai 2019	
<p><u>Beiträge voraussichtlich zu folgenden Veranstaltungen:</u></p>	ab 2018	
<ul style="list-style-type: none"> - Technologisches Seminar WZW - Weurman-Symposium - National meeting of the American Chemical Society (ACS) - EFFoST International Conference - Food Ingredients Europe - Anuga Food Tech 		
<ul style="list-style-type: none"> • Fortbildungsveranstaltung für die Industrie <ul style="list-style-type: none"> - IVV Jahrestagung - Wissenschaftliches Kolloquium des Lehrstuhls für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik 		2016 2017
<ul style="list-style-type: none"> • Veröffentlichung des Kurzberichtes <ul style="list-style-type: none"> - auf den Homepages der Forschungsstellen - Newsletter Forschungsstelle 2 	nach Vorhabenende 1. Quartal 2019	
<ul style="list-style-type: none"> • Beratung interessierter Unternehmen (außerhalb des PA) durch die Forschungsstellen 	nach Vorhabenende	
<ul style="list-style-type: none"> • Übernahme der Ergebnisse in die akademische Lehre bzw. berufliche Aus- und Weiterbildung, u.a. im Rahmen folgender Veranstaltungen: <ul style="list-style-type: none"> - Grundlagen der Lebensmittelchemie (TU München) 		WS 2017/2018

<ul style="list-style-type: none"> - Vorlesung „Innovative Technologien“ (TU München)** 	nach Vorhabenende	
<ul style="list-style-type: none"> - Vorlesung „Technologie der Ölsaaten“ an der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf 	nach Vorhabenende	
<ul style="list-style-type: none"> - Vorlesung „Lebensmittelchemie“ im BSc Studiengang Lebensmittelchemie, TU München 	nach Vorhabenende	

14.5 Bisherige Veröffentlichungen

Präsentationen

Dawid, C.; Gläser, P.; Mittermaier, S.; Eisner, P.; Hofmann, T. IVLV Arbeitsgruppentreffen, Freisinger Tage: Pflanzliche Lebensmittelproteine, Freising, Deutschland, 12. –13.04.2018: Ursachen des bitter-adstringierenden Fehlgeschmacks von pflanzlichen Proteinen, Möglichkeiten zur Qualitätsverbesserung.

Dawid, C.; Gläser, P.; Mittermaier, S.; Eisner, P.; Hofmann, T. Gemeinsame Sitzung der UFOP-Fachkommissionen „Rapsöl“ und „Humanernährung“, Berlin, Deutschland, 25.10.2017: Bitter-astringent off-taste of pea protein isolates - characterization of the key components and technological strategies for their removal or decimation.

Dawid, C.; Gläser, P.; Mittermaier, S.; Eisner, P.; Hofmann, T. Sitzung der UFOP-Fachkommission „Humanernährung“, Berlin, Deutschland, 28.10.2016: Clarification of the reasons for bitter and astringent Off-flavors in plant protein isolates and development of technological parameters for quality improvement.

14.6 Einschätzung zur Realisierbarkeit des geplanten und durchgeführten Transferkonzepts

Teile der Forschungsergebnisse wurden bereits in die Lehre integriert. Inhalte der Vorlesungen „Grundlagen der Lebensmittelchemie“, „Innovative Technologien“, „Technologie der Ölsaaten“ und „Lebensmittelchemie“ des Bachelorstudienganges Lebensmittelchemie der Technischen Universität München wurden angepasst und werden weiterhin um die aktuellen Forschungsergebnisse erweitert. Publikationen der erzielten Ergebnisse werden ab 2018 in anerkannten wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht. Die Veröffentlichung einer Dissertation über die Arbeiten u. a. in diesem Projekt wird voraussichtlich für 2019 zu erwarten

sein. Die Präsentation der Ergebnisse im Rahmen des hochschulöffentlichen „Forschungsseminar für Lebensmittelchemie“ ist für das letzte Quartal 2018 avisiert, Beiträge auf den renommierten Konferenzen Wartburg-Symposium und Weurman-Symposium, sowie dem international angesehenen „National meeting of the American Chemical Society (ACS)“ werden erst ab 2019 erwartet.

14.7 Voraussichtliche Nutzung der Forschungsergebnisse

Die Forschungsergebnisse bieten Nutzen für die Verfahrens- und Lebensmitteltechnik, sowie auch der Ernährungsforschung, Produktionstechnologie und den Herstellern von Lebensmitteln und Getränken. So können Firmen entlang der Produktionskette von Proteinislaten gezielt anhaftende Fehlgeschmacksstoffe reduzieren und somit Herstellungskosten und die Akzeptanz ihrer Produkte steigern. Weiterhin können die sensorisch optimierten pflanzlichen Proteinisolate neue Absatzmärkte erschließen. So stehen pflanzenbasierte Proteinisolate, die bislang aufgrund ihres Fehlgeschmacks nicht oder nur eingeschränkt nutzbar waren, zukünftig für die Anwendung in der Lebensmittelindustrie bereit. Hervorzuheben ist dabei die Substitution von tierischem Eiweiß und die Reduktion maskierender Zusatzstoffe. Diese Optimierung steigert nicht nur die Nachhaltigkeit neuer Produkte, sondern möglicherweise auch deren Verbraucherakzeptanz.

14.8 Angaben über gewerbliche Schutzrechte

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurden keine gewerblichen Schutzrechte eingetragen. Die Anmeldung gewerblicher Schutzrechte auf Ergebnisse oder Teilergebnisse dieses Forschungsvorhabens ist von keiner der beteiligten Forschungsstellen geplant.

14.9 Möglicher Beitrag zur Steigerung der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit der kmU

Oftmals weisen kmU nur geringe FuE-Kapazitäten auf. Durch dieses Projekt können jedoch auch kleinere Unternehmen umfangreiche Kenntnisse über Fehlgeschmackskomponenten und deren Abreicherung im Produktionsprozess erlangen. Das erlangte Wissen zu Herkunft und Wirkkonzentration der Geschmackskomponenten, sowie über neue Ansätze zur technologischen Einflussnahme kann von kmU zur Prozessoptimierung genutzt werden. Oftmals können diese auch im Gegensatz zu multinationalen Unternehmen flexibler auf Verfahrens Anpassungen reagieren.

Mit Hilfe der gewonnenen Forschungsergebnisse ergeben sich ebenfalls neue Absatzmärkte. Der Einsatz pflanzlicher Proteinisolaten in den umsatzstärksten Segmenten „Sport-/Fitness-Ernährung“ und „medizinische Ernährung“ (jeweils 30 % vom Gesamtumsatz), gefolgt von Molke-Erzeugnissen (25 %) und Back-, Fleisch-, und Süßwaren (15 %) war bislang durch den dominierenden Fehlgeschmack nicht oder nur eingeschränkt möglich. Durch Vermeidung von maskierenden Zusatzstoffen und der Substitution tierischer durch pflanzliche Proteine erweitern die Einsatzmöglichkeiten und reduzieren die Herstellungskosten. Diese optimierten Produkte bieten ebenfalls neue Möglichkeiten bei der Bewerbung der mit pflanzlichen Produkten verbundenen ethisch-ökologischen bzw. Nachhaltigkeits-Vorteile für kmU.

14.10 Aussagen zur voraussichtlichen industriellen Umsetzbarkeit der F&E-Ergebnisse nach Projektende

Es ist anzunehmen, dass die Ergebnisse durch die Zusammenarbeit der Forschungsstellen und ihren zahlreichen Expertisen sowie Kontakten zur Industrie zeitnah in der Praxis umsetzbar sind. Die im Rahmen des Projektes gewonnenen Erkenntnisse und entwickelten Verfahren lassen sich gut auch im industriellen Maßstab anwenden. Das umfangreiche Wissen über Art und Struktur der Fehlgeschmackskomponenten hilft je nach Anwendung die Prozessparameter bei der Herstellung von Proteinisolaten in Richtung eines sensorisch optimierten Produktes zu lenken. Da mit dem Fehlgeschmack nun der größte limitierende Faktor beseitigt wurde, ist anzunehmen, dass zeitnah konventionelle, tierische Eiweißquellen durch pflanzliche ersetzt werden können und neue nachhaltige Produkte den Markt durchdringen werden.

14.11 Förderhinweis

... ein Projekt der *Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)*

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Anhänge

A.1 Ausbeute der sequentiellen Lösungsmittlextraktion

Die Ausbeuten der sequentiellen Lösungsmittlextraktion (siehe 6.3.1) sind in Tabelle A-1 ersichtlich.

Tabelle A-1: Ausbeuten der sequentiellen Lösungsmittlextraktion.

<i>Probe</i>	<i>Extraktionsschritt</i>	<i>Ausbeute [g/100 g Isolat]</i>
Pea Proteine 5005454	MeOH/H ₂ O-Extrakt (I)	3,30
	MeOH-Extrakt (II)	7,34
	MeOH/Aceton-Extrakt (III)	2,18
	Ethylacetatextrakt (IV)	0,82
	Pentanextrakt (V)	0,03
	Extraktionsrückstand	81,47
Supro XT 219DIP 2013	MeOH/H ₂ O-Extrakt (I)	21,22
	MeOH-Extrakt (II)	3,91
	MeOH/Aceton-Extrakt (III)	0,26
	Ethylacetatextrakt (IV)	0,01
	Pentanextrakt (V)	0,01
	Extraktionsrückstand	72,01

A.2 Ausbeute der MPLC-Fraktionierung

Die Ausbeuten der MPLC-Fractionen (siehe 6.4.1) sind in Tabelle A-2 aufgeführt.

Tabelle A-2: Ausbeuten der MPLC-Fraktionierung

<i>Probe</i>	<i>Fraktion</i>	<i>Ausbeute [g/100 g Isolat]</i>
MeOH/H ₂ O-Extrakt (I) von Pea Proteine 5005454	I-1	2,4571
	I-2	0,1522
	I-3	0,0657
	I-4	0,0283
	I-5	0,0202
	I-6	0,0215
	I-7	0,0181
	I-8	0,0451
	I-9	0,0446
	I-10	0,1066

Probe	Fraktion	Ausbeute [g/100 g Isolat]
	I-11	0,1768
	I-12	0,0393
	I-13	0,0120



Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V.
Godesberger Allee 142-148 · 53175 Bonn
Telefon: 0228 – 37 20 31
Telefax: 0228 – 37 61 50
E-Mail: fei@fei-bonn.de

Weiterführende Informationen:
www.fei-bonn.de

